

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

**Étude d'un mécanisme de réparation de l'ADN de haute fidélité chez le rotifère bdelloïde Adineta vaga suite à des expositions à des doses élevées de radiations en 1 G et micro gravité simulée**

**Étude d'un mécanisme de réparation de l'ADN de haute fidélité**

Antoine, Christophe

*Award date:*  
2018

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**Faculté des Sciences**

**Étude d'un mécanisme de réparation de l'ADN de haute fidélité chez le rotifère bdelloïde *Adineta vaga* suite à des expositions à des doses élevées de radiations.**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

**Christophe ANTOINE**

**Janvier 2018**

**Université de Namur**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

**Exposition des rotifères bdelloïdes *Adineta vaga* à des doses élevées de radiations en 1G et micro gravité simulée :  
Étude d'un mécanisme de réparation de l'ADN de haute fidélité.**

ANTOINE Christophe

Résumé

Les rotifères bdelloïdes sont des microinvertébrés vivant principalement dans des habitats temporaires régulièrement sujets à la déshydratation. Les bdelloïdes sont décrits comme étant des organismes asexués anciens et sont considérés comme un « scandale évolutif ». Le séquençage de l'espèce *Adineta vaga* a permis de mettre en lumière un génome à l'architecture particulière incompatible avec une méiose classique. Il a été montré chez *Verticillium dahliae*, un champignon phytopathogène asexué, que les réarrangements permettent de s'adapter et donc d'évolution. Il a donc été supposé que les réarrangements jouent le même rôle chez *A. vaga*.

Dans le cadre de ce mémoire, la fidélité des mécanismes de réparation chez *Adineta vaga* a été étudiée par la méthode des profils de restriction couplés à la *Pulse-Field Gel Electrophoresis*. Les bdelloïdes ont été irradiés aux rayons X afin d'induire massivement des cassures dans le génome. Par conséquent, cela augmenterait théoriquement la probabilité d'observer des événements de réarrangements si ceux-ci arrivent fréquemment chez *A. vaga*. Plusieurs lignées clonales ont été isolées afin de permettre une étude de la réparation chez des clones isolés. Finalement, certains bdelloïdes ont été placés en microgravité simulée au SCKCEN à Mol afin d'étudier les effets de l'absence de gravité sur le processus de réparation.

Les résultats de ces expériences montrent que les bdelloïdes réparent de façon efficace leur génome. Aucun réarrangement chromosomique n'a pu être observé, ce qui suggère que ceux-ci sont peu fréquents, voir rares. Les bdelloïdes soumis à la microgravité simulée ne présentent pas de différence de cinétique de réparation par rapport aux bdelloïdes en gravité normale.

Mémoire de master 120 en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

Janvier 2018

**Promoteur :** Professeur Karine Van Doninck

**Encadrant :** Docteur Boris Hespeels

## Remerciements

Je remercie ma promotrice, le professeur Karine Van Doninck, ainsi que toute son équipe de m'avoir accueilli au sein du LEGE et d'avoir pu corriger mon mémoire.

Je remercie plus particulièrement mon encadrant, Boris Hespeels, pour m'avoir guidé tout au long de cette année ainsi que pour avoir pris du temps pour les relectures de mon mémoire.

Merci également au professeur Stéphane Lucas, prof. Anne-Catherine Heuskin et Tijani Tabarrant au sein du LARN d'avoir pu me permettre d'utiliser l'irradiateur aux rayons X afin de réaliser correctement mes expériences.

Je tenais à remercier le professeur Sarah Baatout de m'avoir ouvert les portes de l'unité de radiobiologie au SCK•CEN à Mol pour réaliser les simulations de microgravité. Merci à Marjan Moreels et Randy Vermeesen de m'avoir aidé dans ces expériences.

Merci au professeur Bernard Hallet, prof. Anne-Catherine Heuskin, Matthieu Terwagne et Blanche Martin d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de passer du temps à la lecture de mon mémoire.

Enfin, merci à mes proches ainsi qu'à tous les autres mémorants pour cette année inoubliable.

**Table des matières générale :**

1.	INTRODUCTION .....	5
2.	RÉSUMÉ DES OBJECTIFS DU MÉMOIRE .....	23
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	25
4.	RÉSULTATS .....	31
5.	DISCUSSIONS .....	43
6.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	53
7.	RÉFÉRENCES .....	54
8.	ANNEXES.....	62

## Table des matières Introduction :

<b>1.1.</b>	<b>LES ROTIFÈRES BDELLOÏDES.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.</b>	<b>L'IMPACT DE L'ASEXUALITÉ.....</b>	<b>6</b>
1.2.1.	UN GÉNOME PARTICULIER .....	6
1.2.2.	UN AUTRE TYPE DE MEIOSE ? .....	7
<b>1.3.</b>	<b>AUTRES PARTICULARITES DANS LE GENOME BDELLOÏDES D'ADINETA VAGA.....</b>	<b>8</b>
1.3.1.	SIGNATURES DE CONVERSIONS GÉNIQUES .....	8
1.3.2.	ACQUISITION DE GÈNES NON-MÉTAZOAIRE.....	9
1.3.3.	RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES .....	10
1.3.4.	LES RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES CHEZ LES ASEXUÉS .....	10
<b>1.4.</b>	<b>CASSURES DOUBLE BRIN, ORIGINE ET CONSEQUENCES.....</b>	<b>12</b>
1.4.1.	DESSICCATION ET STRESS OXYDATIF .....	12
1.4.1.1.	<i>Processus morphologiques.....</i>	12
1.4.1.2.	<i>Cassures double brin et stress oxydatif.....</i>	14
1.4.2.	TYPES DE CASSURES DOUBLE BRIN.....	14
1.4.3.	LES RADIATIONS IONISANTES .....	15
1.4.3.1.	<i>Dépôt d'énergie.....</i>	16
1.4.3.2.	<i>High- et Low Linear Energy Transfer.....</i>	16
<b>1.5.</b>	<b>RÉPARATION DES DSB.....</b>	<b>17</b>
1.5.1.	CINÉTIQUE DE RÉPARATION .....	17
1.5.2.	MÉCANISMES DE RÉPARATION.....	17
1.5.2.1.	<i>Recombinaison homologue.....</i>	17
1.5.2.2.	<i>Non Homologous End-Joining - NHEJ.....</i>	18
1.5.3.	EFFICACITÉ DE LA RÉPARATION.....	19
<b>1.6.</b>	<b>L'ENVIRONNEMENT SPATIAL.....</b>	<b>21</b>
1.6.1.	LES RADIATIONS IONISANTES .....	21
1.6.2.	LE VIDE ET LA TEMPÉRATURE .....	22
1.6.3.	LA MICROGRAVITÉ .....	22

# 1. Introduction

## 1.1. Les rotifères bdelloïdes

Les rotifères bdelloïdes sont de petits invertébrés ubiquistes d'une taille allant de 50 à 2.000  $\mu\text{m}$  en fonction des espèces (Segers, 2008). Ils ont été initialement décrits par Anthony van Leeuwenhoek en 1702 lorsque ce dernier a réhydraté des matières organiques desséchées telles que des feuilles récoltées dans une gouttière. Il a alors observé, entre autres, de petits « *animalcules* » bougeant peu de temps après avoir ajouté de l'eau (van Leeuwenhoek, 1702). Ces animalcules étaient des rotifères bdelloïdes.

Leur nom, « rotifère », signifie littéralement « roues qui tournent ». Observée au microscope, la structure ciliée au niveau de leur tête semble en effet former deux roues tournant dans des sens opposés (Figure 1) (Hudson & Gosse, 1886; Fontaneto & Barraclough, 2015). Ces cils servent à filtrer l'eau et à leur faire parvenir la nourriture, composée de bactéries et d'algues, à leur bouche. Ce « rotor » peut également servir de moyen de locomotion pour certaines espèces, et est un des caractères dérivés propres des rotifères (Shiel, 1995). Néanmoins cette structure peut être positionnée en dessous de la tête, comme dans le cas du rotifère bdelloïde *Adineta vaga* (Figure 2), permettant alors un grattage du substrat plutôt qu'une filtration de l'eau environnante. Une fois la nourriture ingérée, celle-ci est broyée par le « mastax ». Cette région musculaire au niveau du pharynx est composée de mâchoires chitineuses (aussi nommées trophi). La forme du mastax bdelloïdes et le nombre de trophi permettent souvent l'identification de la famille de rotifère bdelloïde (Shiel, 1995). Les bdelloïdes sont renommés pour leur mode de reproduction asexué : les populations sont constituées exclusivement de femelles pondant des œufs par parthénogenèse (Gilbert, 1974; Ricci, 1987; Welch *et al.*, 2004; Ricci *et al.*, 2007; Flot *et al.*, 2013). Par ailleurs, plus de 460 espèces asexuées différentes ont été décrites dans le clade des rotifères bdelloïdes (Segers, 2007).

Les rotifères bdelloïdes ont une autre particularité, la capacité de se dessécher à n'importe quel stade de leur vie. Ils vivent dans des milieux pouvant être souvent sujets à la déshydratation, tels que les flaques d'eau temporaire, les mousses et les lichens. Certaines espèces peuvent également survivre en Antarctique, habitat où l'eau liquide vient à manquer fréquemment (Shiel, 1995). Cette particularité est assez unique dans le règne animal, il n'y a que peu d'autres animaux qui partagent cette caractéristique, notamment les nématodes et tardigrades.

Les rotifères bdelloïdes appartiennent au phylum Rotifera (Figure 3) (Dunn *et al.*, 2014). Les organismes appartenant à ce phylum possèdent un rotor de cils, un mastax, une glande pédale et sont eutéliques (nombre fixe de cellules à la naissance) (Garey *et al.*, 1996; Ricci & Caprioli, 2005). Les rotifères ainsi que les acanthocephales forment l'embranchement des syndermates, dont la caractéristique est de posséder un épiderme syncitial (Garey *et al.*, 1998). Cet embranchement est lui-même compris au sein des lophotrochozoaires (Paps *et al.*, 2009). À l'heure actuelle, 3 classes de rotifères sont décrites. Celle des monogonontes, qui comprend des organismes ayant la capacité de se reproduire de façon asexuée dans des conditions environnementales stables (Gilbert, 2003) et sexuée quand les conditions deviennent défavorables (Segers, 2008). Ils possèdent également une seule gonade, caractéristique propre à ce groupe leur



ayant valu leur nom (Garey *et al.*, 1996). La deuxième est celle des bdelloïdes, individus se reproduisant uniquement par parthénogenèse. Cette classe est constituée de 4 familles, 18 genres (Ricci, 1987) et plus d'environ 460 espèces décrites (Segers, 2007). Et enfin les seisonacés, classe ne comprenant que 3 espèces actuellement, étant sexuées (Segers, 2008). Cependant, la phylogénie exacte du phylum des rotifères et des acanthocephales est encore débattue (Figure 4) (Fontaneto & Jondelius, 2011; Fontaneto, 2014).

## 1.2. L'impact de l'asexualité

Une des caractéristiques les plus particulières chez les bdelloïdes est leur asexualité. Ils ne se reproduisent que par parthénogenèse, c'est-à-dire en produisant des œufs par division mitotique (Ricci, 1987; Ricci & Perletti, 2006; Fontaneto & Barraclough, 2015). Plusieurs observations suggèrent que leur asexualité est obligatoire. En effet, jusqu'à présent, aucun mâle, hermaphrodite ou méiose conventionnelle n'a pu être observé (Welch & Meselson, 2000).

Selon Maynard Smith (1986), l'asexualité est un cul-de-sac évolutif, ne permettant pas la survie à long terme de l'espèce asexuée, et cela pour deux principales raisons. La première est la tendance à accumuler des mutations (et dont certaines délétères) au cours du temps (aussi appelé *Muller's ratchet*). Ce phénomène est dû à l'absence de recombinaisons méiotiques. Chez une espèce sexuée, la reproduction sexuée permet de produire des descendants ayant moins de mutations que la lignée parentale, les asexuées accumulent les mutations sans pouvoir diminuer leur taux (Muller, 1964; Felsenstein, 1974). La deuxième raison est l'absence de variabilité génétique produite au sein des descendants d'une lignée asexuée, due au manque de recombinaisons génétiques lors de la méiose, et qui dès lors limite l'évolution de l'espèce, et donc son adaptabilité face aux changements environnementaux (Maynard Smith, 1986).

Cependant, la classe des bdelloïdes compte plus de 460 espèces décrites morphologiquement (Segers, 2007), formant le clade taxonomique le plus élevé au sein des animaux ne comprenant que des espèces asexuées. Par ailleurs des fossiles de bdelloïdes ont été retrouvés dans de l'ambre datant de 30 à 45 millions d'années (Poinar & Ricci, 1992). Pour ces différentes raisons, les rotifères bdelloïdes sont considérés comme étant des asexués anciens formant un paradoxe en biologie évolutive, et dès lors bdelloïdes également appelés « scandales de l'évolution » (Maynard Smith, 1986).

En vue d'éclaircir ce paradoxe et cette asexualité ancienne, l'équipe du Professeur Karine Van Doninck s'est penchée sur l'analyse du génome d'une lignée de rotifères bdelloïdes, *Adineta vaga*. Ce génome a été séquencé, assemblé et publié en 2013 par Flot *et al.*. Les différentes observations de cette étude, ainsi que celles de plusieurs autres études, vont dans le sens d'une ancienne asexualité des bdelloïdes.

### 1.2.1. Un génome particulier

*Adineta vaga* (~244 Mb) contient 12 chromosomes (Welch & Meselson, 1998, Julie Virgo, observation personnelle), et son génome a été séquencé (Flot *et al.*, 2013). Il ressort de cette étude que l'architecture du génome de ce bdelloïde est incompatible avec une méiose classique. En méiose dite conventionnelle, l'homologie entre les paires de chromosomes



maintenue chez les organismes sexués permet leur appariement pendant la métaphase I afin de former plus tard deux cellules filles haploïdes (Figure 5) (Page & Hawley, 2003). Cependant, chez *A. vago*, cette homologie n'est pas rencontrée et cela pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, des régions palindromiques, c'est-à-dire répétées et inversées (Figure 6) ont été observées dans leur génome. Un des « bras » d'une région palindromique contient des séquences alléliques homologues à l'autre bras. Un appariement de ces séquences formerait donc une structure en « épingle à cheveux ». Il serait donc impossible de séparer ces copies dans deux cellules filles car elles sont liées sur le même fragment d'ADN. Aucune autre copie des allèles présents dans la région palindromique n'est retrouvée ailleurs dans le génome. Les régions palindromiques atteignent une longueur de 705kb et l'ensemble de ces régions contient 148 gènes, 17 régions de ce type ont pu être détectées dans le génome de *A. vago* (Figure 7) (Flot *et al.*, 2013).

En plus des régions palindromiques, 3 régions directement répétées (Figure 8) ont été observées dans le génome et impliquent un total de 50 gènes (Flot *et al.*, 2013). Comme dans le cas des régions palindromiques, les copies de gènes sont donc localisées sur le même fragment d'ADN, rendant impossible toute méiose classique (Figure 5 et 7). La longueur totale des régions palindromiques et répétées est de 7,5 Mb, soit 3,3% du génome (Flot *et al.*, 2013).

Le génome de *A. vago* contient également des centaines de *colinearity breakpoints* ou cassures de colinéarité (Figure 7) (Flot *et al.*, 2013). Une cassure de colinéarité est une rupture de l'ordre des gènes d'une séquence par rapport à l'ordre de la séquence allélique homologue. L'homologie chromosomique n'est donc pas maintenue. L'ensemble de toutes ces caractéristiques empêche théoriquement l'appariement correct des chromosomes (Flot *et al.*, 2013). Une méiose conventionnelle n'est donc pas réalisable chez *A. vago*.

Le génome des bdelloïdes se présente également sous la forme d'une structure tétraploïde dégénérée (Mark Welch *et al.*, 2008; Hur *et al.*, 2009; Flot *et al.* 2013). Cette dernière proviendrait probablement d'un événement de duplication complète du génome ou d'une ancienne hybridation. Chaque gène s'est alors retrouvé en 4 copies, les 2 allèles d'origine ayant été dupliqués. Les copies de gènes provenant de l'évènement de duplication sont appelées ohnologues (anciens homologues formés par la duplication du génome) (Flot *et al.*, 2013). Ensuite, au cours du temps, plusieurs modifications génomiques se sont produites (telles que des délétions de certains gènes), formant la structure tétraploïde dégénérée observée aujourd'hui (Flot *et al.*, 2013 ; Hespels, thèse de Doctorat 2016).

### **1.2.2. Un autre type de méiose ?**

Dans le règne eucaryote, d'autres alternatives à la méiose classique existent (méioses « non-conventionnelles »). Ces dernières permettraient une reproduction sexuée malgré une architecture génomique hors norme.

Chez la levure *Candida albicans*, il est possible que deux cellules diploïdes fusionnent pour former une cellule tétraploïde (appelé cycle parasexuel). Ensuite, la cellule perd de façon aléatoire, mais contrôlée, des chromosomes pour arriver à un niveau diploïde (Forche *et al.*,

2008), sans appariement de chromosomes homologues. Il n'y a donc pas de méiose ou de formation de gamètes dans la parasexualité. Cependant, ces levures ne possèdent pas un génome hors-norme. Rendant l'extrapolation de cette hypothèse aux bdelloïdes peu probable.

Certaines plantes, comme celles du genre *Oenothera* ou *Rhoeo* (Holsinger *et al.*, 1984; Golczyk, 2011; Rauwolf *et al.*, 2011; Golczyk *et al.*, 2014), utilisent une autre alternative. Les translocations chromosomiques au sein de leur génome empêchent l'appariement de paires de chromosomes. Seules les télomères s'apparient ce qui permet la formation d'un anneau (Signorovitch *et al.*, 2015; Debortoli *et al.*, 2016) (Figure 9). Des échanges de régions (« crossing-over ») peuvent alors uniquement se produire au niveau des télomères. Dans cet anneau, les chromosomes provenant de la mère et du père s'alternent. Ensuite, les chromosomes d'un des deux parents (la mère par exemple) sont ségrégués d'un côté de la cellule alors que ceux de l'autre parent (père) le sont de l'autre côté. L'hétérozygotie est maintenue par la fusion ultérieure des deux gamètes, portant chacun un jeu de chromosomes maternel ou paternel. Des recombinaisons ne peuvent survenir qu'aux extrémités télomériques (Signorovitch *et al.*, 2015). Ce modèle de méiose très particulière porte le nom de PTH ou *Permanent Translocation Heterozygosity* (Cleland, 1972) et a uniquement été observée chez ces plantes.

### **1.3. Autres particularités dans le génome bdelloïdes d'*Adineta vaga***

Malgré l'avancée des connaissances sur l'asexualité des rotifères bdelloïdes, certaines questions restent à élucider. Premièrement, l'existence des bdelloïdes et de leur asexualité semblent dater de plusieurs millions d'années (Poinar & Ricci, 1992). Comment font-ils ? Y a-t-il un lien avec leur dessiccation ? L'étude des conséquences des mécanismes de l'évolution des bdelloïdes permettrait d'améliorer les connaissances à ce sujet. Deuxièmement, le génome de *A. vaga* présente plusieurs caractéristiques peu communes parmi les métazoaires. Flot *et al.* (2013) ont également trouvé de nombreuses signatures de conversions géniques dans le génome de *A. vaga*, un mécanisme qui pourrait contrer l'accumulation des mutations au cours du temps (*Muller's ratchet*). Il y a aussi la présence d'un grand nombre de gènes non-métazoaires, acquis par transfert horizontal. Enfin, il y a la présence de nombreux réarrangements chromosomiques. La génomique comparative permettrait de mieux comprendre l'origine et l'évolution d'un tel génome en mosaïque et également d'expliquer sa stabilité ou non au cours du temps.

#### **1.3.1. Signatures de conversions géniques**

Comme cité ci-dessus, la conversion génique est un mécanisme qui pourrait contrer l'accumulation de mutations chez une lignée asexuée. Tel que décrit dans la Figure 10, chez les organismes sexués pour une mutation délétère donnée, la méiose permet de produire des gamètes dont certains la possèdent et d'autres non. La fertilisation avec un autre organisme permettra de générer différents nouveaux génotypes. Certains descendants auront gardé la mutation et d'autres ne l'auront pas. Les descendants ne possédant pas la mutation délétère peuvent être sélectionnés s'ils possèdent un avantage évolutif (Figure 10, schéma de gauche) (Muller, 1964; Felsenstein, 1974). Chez les espèces asexuées, ces recombinaisons n'existent pas, la descendance hérite donc des mutations acquises par le parent. Cependant, si un processus de conversion génique se

produit au niveau d'une mutation, il est possible que celle-ci soit éliminée (Figure 10, schéma de droite). Ce phénomène de conversion génique entre en action quand une cassure double brin est induite dans le génome. Pour réparer cette cassure, la machinerie de réparation se base sur la séquence homologue (Marais, 2003).

Ce processus se déroule en plusieurs étapes après la formation d'une cassure double brin ou *Double Strand Break* (abrévié par DSB) (Figure 11). L'ADN est partiellement digéré pour former des extrémités 3'-OH protrudantes qui vont ensuite s'apparier à la séquence homologue pour former un hétéroduplexe (présence de deux segments d'ADN complémentaire mais d'origine différente). Les brins d'ADN sont synthétisés et forment deux jonctions de Holiday (Figure 11). Enfin, ces jonctions sont résolues en cassant et reliant l'ADN. De possibles recombinaisons peuvent apparaître à la suite de cette dernière étape (Marais, 2003; Duret & Galtier, 2009). L'ADN endommagé au départ peut donc être réparé sur base de l'autre copie. La conversion génique permet par conséquent d'enlever une mutation, pouvant être délétère, du génome, ou de rendre l'organisme homozygote pour cette mutation. Dans le génome de *A. vaga*, des signatures de conversion génique ont été observées, un mécanisme qui peut permettre à une espèce asexuée de contrecarrer l'accumulation des mutations (*Muller's ratchet*) (Flot *et al.*, 2013).

### **1.3.2. Acquisition de gènes non-métazoaires**

Le deuxième problème majeur de la reproduction asexuée est le manque de variabilité génétique limitant l'évolution de l'espèce (Maynard Smith, 1986; Simon *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2007). Sans méiose et recombinaisons chromosomiques, les génotypes ne peuvent varier que par l'apparition spontanée de mutations ponctuelles. Cependant la variabilité génétique peut être induite par d'autres processus tels que les transferts horizontaux de gènes ou HGT (*Horizontal Gene Transfer*). D'abord décrits chez les procaryotes (Ochman *et al.*, 2000; Davies & Davies, 2010), les HGT se caractérisent par l'échange horizontal de matériel génétique entre deux espèces apparentées ou non (Ochman *et al.*, 2000). Ces échanges peuvent augmenter le fitness du receveur, permettant la fixation du gène au sein de la population. Pour découvrir la présence de HGT, les chercheurs tentent de détecter des séquences étrangères dans le génome de l'organisme étudié. Cela se fait principalement en tentant de détecter de potentielles homologies avec une autre espèce (Flot *et al.*, 2013).

Le processus des transferts horizontaux de gènes se déroule fréquemment chez les procaryotes et est un mécanisme évolutif important pour ces organismes (Koonin *et al.*, 2001; Boucher *et al.*, 2003; Gyles & Boerlin, 2014). Les HGT ont également été découverts chez des eucaryotes tels que des plantes (Richardson & Palmer, 2007), des nématodes (Danchin, 2011), et les rotifères bdelloïdes (Gladyshev *et al.*, 2008; Boschetti *et al.*, 2012; Flot *et al.*, 2013; Eyres *et al.*, 2015; Debortoli *et al.*, 2016). Il a été observé que plus de 8% du génome de *A. vaga* sont d'origine non-métazoaire (Flot *et al.*, 2013). De plus, environ 20% de ces gènes transmis ont été retrouvés en 4 copies, ce qui signifie qu'ils ont probablement été acquis avant l'évènement de duplication du génome des bdelloïdes (Hur *et al.*, 2009). Certains gènes ont aussi été trouvés en une seule copie, sans introns (caractéristique des procaryotes) et avec un pourcentage en GC différent de celui du génome de *A. vaga*. Ces gènes auraient été acquis plus récemment. Ces caractéristiques suggèrent que les transferts horizontaux de gènes sont un processus ancien et récents chez les rotifères bdelloïdes (Flot *et al.*, 2013; Eyres *et al.*, 2015).



La présence importante de ces gènes majoritairement codant pour des enzymes (Boschetti *et al.*, 2012; Eyres *et al.*, 2015) au sein du génome laisse penser que les HGT procurent un avantage aux bdelloïdes. De la même manière que chez les procaryotes, les HGT chez les bdelloïdes permettraient de fournir de nouvelles protéines permettant éventuellement d'augmenter leur fitness. Boschetti *et al.* (2012) ont démontré dans leur transcriptome du bdelloïde *Adineta ricciae* que la plupart des gènes non-métozoaires codent pour des enzymes, certains impliqués dans la résistance à la dessiccation. De plus, il a été démontré que des espèces subissant souvent des périodes de dessiccation ont un pourcentage de gènes d'origine non-métazoaire plus élevé que des espèces qui ne subissent pas de dessiccation (Eyres *et al.*, 2015). Par conséquent, les HGT pourraient augmenter les capacités de dessiccation des bdelloïdes et seraient favorisés lors des périodes de dessèchement.

Une des hypothèses actuelles concernant l'intégration d'ADN au sein des rotifères tient compte de leur capacité à se dessécher. Pendant la dessiccation, quand les membranes se perméabilisent, l'ADN étranger présent dans l'estomac ou l'intestin pourrait passer à travers l'épithélium syncytial du tube digestif. Il pourrait ensuite s'intégrer dans les oocytes des ovaires (également en tissu syncytial) directement accolés au système digestif (Hespeels *et al.*, 2014). L'ADN étranger serait alors intégré au sein des lignées germinales pendant la réparation de l'ADN (Gladyshev & Arkhipova, 2010), finalisant le processus de transfert horizontal de gène. La descendance hériterait alors de ces gènes nouvellement acquis. Cependant, ce phénomène n'a pas encore pu être mis en évidence, et si tel est le cas, sa fréquence reste encore inconnue.

### **1.3.3. Réarrangements chromosomiques**

La troisième hypothèse permettant d'expliquer l'évolution des bdelloïdes ainsi que l'architecture particulière du génome d'*A. vaga* sont les réarrangements chromosomiques (Seidl & Thomma, 2014). Plusieurs types de réarrangements existent : les duplications, les délétions, les inversions ou les translocations (Schubert, 2007; Schubert & Lysak, 2011). Ces phénomènes peuvent influencer positivement ou négativement le fitness de l'organisme. Plusieurs cas ont déjà été documentés dans la littérature chez différents organismes, je n'en cite que deux bien décrits ici. Une duplication d'une partie de chromosome peut créer deux copies d'un même gène pouvant ensuite évoluer séparément (Presgraves, 2005). Chez *Saccharomyces cereviae* par exemple, la duplication de plusieurs transporteurs de sucres à haute affinité (HXT6-HXT7) a permis d'augmenter le fitness chez des populations soumises à une restriction en sucres (Gresham *et al.*, 2008). Une délétion de matériel génétique peut également permettre d'augmenter le fitness. Chez *Magnaporthe oryzae*, un pathogène des plants de riz, la perte de l'effecteur *Avr-Pita* empêche cet organisme d'être reconnu par le récepteur immunitaire Pita (Orbach *et al.*, 2000). Chez certaines lignées de cette espèce, le gène *Avr-Pita*, n'est pas perdu mais parfois dupliqué ou déplacé sur un autre chromosome. Les échanges horizontaux de gènes entre différentes lignées possédant ou ne possédant pas *Avr-Pita* permettent à celles ayant perdu ce gène de l'acquérir à nouveau (Chuma *et al.*, 2011).

### **1.3.4. Les réarrangements chromosomiques chez les asexués**

Afin de mieux comprendre le potentiel évolutif des réarrangements chromosomiques chez les asexués, prenons un exemple bien connu. De Jonge *et al.* en 2013 ont étudié *Verticilium*

*dahliae*, un champignon phytopathogène pouvant infecter plusieurs centaines d'espèces de dicotylédones (Klosterman *et al.*, 2009; Atallah *et al.*, 2010). Malgré la présence de deux « sexes » (appelés *mating types* chez les champignons), *V. dahliae* est considéré comme étant asexué car aucun cycle sexuel n'a jamais été observé jusqu'à ce jour (Usami *et al.*, 2009a; b; Atallah *et al.*, 2010; De Jonge *et al.*, 2013).

Dans leur étude, De Jonge *et al.* ont recherché de possibles modifications de structure de chromosomes chez 11 lignées de *V. dahliae* en utilisant un gel PFGE (voir *Technique moléculaire PFGE*). Leurs résultats montrent que ces lignées, pourtant proches (de ~99,5% à ~99,98% d'identité basés sur le comptage des SNPs<sup>1</sup> des séquences nucléotidiques de chaque lignée), présentent des chromosomes de différentes tailles (Figure 12) (De Jonge *et al.*, 2013). Ces derniers seraient la conséquence directe de réarrangements intra- et inter-chromosomiques ayant apparu indépendamment dans chaque lignée. La comparaison de chromosomes entre les deux lignées les plus proches montre également que certaines parties génomiques ne se trouvent pas à la même position (Figure 13). De plus, ces « *breakpoints* » sont flanqués de rétrotransposons, souvent associés à une instabilité génomique (Lemoine *et al.*, 2005; Mieczkowski *et al.*, 2006; Maxwell *et al.*, 2011). Ces régions riches en régions répétées peuvent induire des changements phénotypiques comme une augmentation de la pathogénicité. Ces modifications permettent à *V. dahliae* de s'adapter rapidement et donc d'évoluer (De Jonge *et al.*, 2013). En résumé, les auteurs ont pu démontrer que les processus de réarrangements chromosomiques ont lieu au sein d'une espèce asexuée et qu'ils étaient une force évolutive majeure. Il est dès lors intéressant d'étudier l'évolution génomique de lignées asexuées de rotifères bdelloïdes et d'analyser l'évolution de leurs breakpoints et palindromes, surtout suite à des cassures double brin induites.

#### Technique moléculaire | PFGE

Une *Pulse Field Gel Electrophoresis* ou électrophorèse en champ pulsé, est une méthode permettant de séparer des fragments d'ADN plus grand qu'une électrophorèse classique. Cette dernière permet en général de fractionner des fragments allant jusqu'à ~50 kb. Une PFGE permet en revanche de séparer des fragments de ~10 Mb en fonction des paramètres utilisés (Herschleb *et al.*, 2007).

Une électrophorèse classique possède une paire d'électrodes permettant de créer un champ électrique uniforme afin de faire migrer l'ADN dans une direction. La PFGE possède quant à elle 2 ou 3 paires d'électrodes. Le principe repose sur l'alternance des courants électriques des paires d'électrodes. Le champ électrique varie de direction, ce qui permet de dérouler et de faire « serpenter » les longues molécules d'ADN au sein du maillage gel (Basim & Basim, 2001; Herschleb *et al.*, 2007).

Plusieurs paramètres peuvent être modifiés tels que le temps de migration, le temps nécessaire pour faire varier le champ électrique (variation initiale et finale, parfois appelé *switch time* dans le cadre de ce mémoire), le voltage appliqué, la température et l'angle du champ électrique. Le temps de migration est fixé à 22h et l'angle du champ électrique à 120°. Ces paramètres ont été modifiés lors des tests d'optimisation. Une fois optimisés, ils ont été fixés. Les seuls paramètres inchangés étaient le temps de migration (22h) et l'angle du champ électrique (120°). Deux machines ont été utilisées pour les gels PFGE, la CHEF MAPPER et la CHEF DRII (Biorad®). Il est important de souligner que le voltage appliqué était identique mais affiché de façon différente (190V pour la CHEF DRII ou 5,5V/cm pour la CHEF MAPPER).

<sup>1</sup> *Single nucleotide polymorphisms*

## 1.4. Cassures double brin, origine et conséquences

L'ADN est essentiel aux organismes sur Terre pour survivre et est transmis à la descendance quel que soit le moyen de reproduction. Cependant, il arrive que celui-ci soit endommagé. Plusieurs facteurs environnementaux peuvent induire des dommages au niveau de l'ADN, tels que les rayons ultraviolets, les radiations ionisantes, la fumée de cigarette chez les humains, des agents chimiques, ... (Hoeijmakers, 2001). D'autre part, des facteurs internes tels que la production de *Reactive Oxygen Species* (ou ROS) dus à la respiration ou la peroxydation des lipides (Cadet *et al.*, 1997; Hoeijmakers, 2001) peuvent également induire des lésions au génome. Les dommages à l'ADN peuvent être de plusieurs types. Le premier type de dommage est la modification de base. Par exemple, une guanine peut être altérée en 8-oxoguanine. À cause de sa conformation, une adénine risque d'être incorporée en face de cette base endommagée à la place d'une cytosine (Michaels *et al.*, 1992). L'ADN peut aussi être « cassé » de deux manières, soit sur un des deux brins, alors appelé *Single-Strand Break* ou SSB (Caldecott, 2008), soit sur les deux brins (deux cassures à maximum 10 nucléotides de distance (Schipler & Iliakis, 2013)), appelé *Double-Strand Break* ou DSB (Pierce *et al.*, 2001; Lieber, 2010). Dans ce dernier cas, l'ADN est coupé, ce qui signifie que deux extrémités libres sont alors créées. Après l'évènement de cassures, les dommages à l'ADN sont réparés par différents moyens comme la recombinaison homologue ou le *Non-homologous End Joining* (NHEJ) (San Filippo *et al.*, 2008; Lieber, 2010).

### 1.4.1. Dessiccation et stress oxydatif

Dans la nature, les cassures double brin chez les rotifères sont principalement induites par les périodes de dessiccation qu'ils subissent fréquemment dans leur environnement semi-terrestre tels que les mousses et lichens (Hespeels *et al.*, 2014).

Les organismes capables de survivre en étant presque totalement déshydratés rentrent en état d'anhydrobiose, ce qui signifie littéralement « vie sans eau » (Alpert 2005). Un organisme est considéré complètement desséché quand son pourcentage d'eau descend en dessous de 10% de son poids total. A ce niveau, il n'y a plus assez de molécules d'eau pour former une monocouche autour des macromolécules, arrêtant alors les réactions enzymatiques, et par conséquent, le métabolisme général (Alpert 2005; Billi and Potts 2002). L'anhydrobiose est « apparue » plusieurs fois pendant l'évolution et ce, dans différents clades. La dessiccation a été observée chez certains procaryotes (Potts, 1994), plantes (Gaff, 1977), larves d'insectes (Watanabe *et al.*, 2002) ainsi que 3 phylum de métazoaires : les tardigrades (Wright, 1989), les nématodes (Womersley & Ching, 1989) et les rotifères (Ricci, 2001).

#### 1.4.1.1. Processus morphologiques

Le processus de dessiccation implique de nombreux changements au sein du bdelloïde et se déroule en deux étapes. Tout d'abord, le rotifère change morphologiquement de forme, et passe au stade « tun ». Ensuite, le bdelloïde va se dessécher et entrer dans un état complet d'anhydrobiose (Ricci *et al.*, 2003, 2008). Il semblerait que le processus de dessiccation ne soit pas demandeur d'énergie pour les bdelloïdes (Ricci & Caprioli, 2005). La formation de l'état tun est permise par une vidange partielle du tube digestif, la ponte des œufs si présents et la contraction de la tête et du pied dans le tronc (Ricci *et al.*, 2008). Ce dernier changement



morphologique est possible grâce à la contraction des muscles longitudinaux, au contraire des muscles circulaires qui ne semblent pas jouer un rôle dans la formation du tun (Ricci *et al.*, 2008). En rentrant ses extrémités, le rotifère diminue son rapport surface-volume. Cela permet ainsi une diminution du taux de perte d'eau pendant le processus de dessiccation pour éviter une déshydratation trop rapide (Ricci *et al.*, 2003). De plus, les pertes d'eau sont réduites par la fermeture active des pores de l'épiderme, pouvant se rouvrir après réhydratation (Figure 19) (Marotta *et al.*, 2010). De plus, les rotifères se regroupent pendant la dessiccation, permettant probablement de diminuer encore plus le taux de déshydratation (Hespeels *et al.*, 2014).

Les pertes d'eau induisent une réduction de volume de l'animal et la formation de replis longitudinaux, ainsi qu'une réduction de l'épaisseur du *tun* qui va alors s'aplatir dorso-ventralement (Ricci *et al.*, 2008). Son poids va également diminuer drastiquement. Alors qu'il est composé d'environ 95% d'eau à l'état hydraté (Ricci *et al.*, 2008), sa forme desséchée ne comporte plus que quelques pourcents d'eau (6.5% chez *A. vaga* (Hespeels *et al.*, 2014)). Les cellules du rotifère rétrécissent mais gardent l'intégrité de leurs membranes et de leurs organites. Malgré cette diminution drastique du contenu en eau, la position des organes d'un rotifère desséché ressemble fortement à celle d'un individu hydraté (Figure 20) (Marotta *et al.*, 2010).

Du point de vue des organes internes, de nombreux changements ont été observés chez le rotifère bdelloïde *Macrotrachela quadricornifera*. Par exemple, le ganglion cérébral est aplati et perd sa structure, alors que les neurones conservent toute leur intégrité ainsi que les vésicules contenant les neurotransmetteurs. Les cils vibratiles de la tête sont également touchés car leur structure interne composée de  $9 \times 2 + 2$  axonèmes est perdue, rendant impossible toute fonction physiologique de ceux-ci. Cependant, les microtubules ont été observés intacts, ce qui signifie que la désorganisation de la structure des cils est probablement due à la perte ou le décrochage de protéines structurantes. L'observation de ces filaments microtubulaires non endommagés suggère que la réorganisation du cytosquelette serait rapide pendant la réhydratation, car les structures de base (microtubules) sont déjà présentes (Marotta *et al.*, 2010). L'absence de toute fonction digestive a aussi été mise en évidence par l'observation de la diminution de la lumière de l'estomac ainsi que par l'absence de vacuoles hétérophagiques (permettant la digestion cellulaire). Néanmoins, la présence de grandes vacuoles lipidiques remplissant l'estomac rétréci laisse penser qu'il s'agirait d'une réserve d'énergie directement disponible lors du réveil du rotifère (Marotta *et al.*, 2010). La transcription et la traduction semblent aussi être fortement diminuées voire totalement arrêtées à cause de l'augmentation du pourcentage d'hétérochromatine et d'une diminution du nucléole. Le vitellarium (appareil reproducteur situé à côté du système digestif (Ricci & Melone, 2000)) diminue également en taille pendant la dessiccation (Marotta *et al.*, 2012). Enfin, des granules ressemblant à des ribosomes ont été observés autour des mitochondries de rotifères desséchés. Ces granules permettraient d'accélérer la réactivation de certaines protéines pendant la réhydratation en les faisant passer dans la mitochondrie (Marotta *et al.*, 2010).

Même si le rotifère bdelloïde contrôle en partie son processus de déshydratation, de nombreux facteurs extérieurs peuvent influencer le taux de survie post dessiccation. Caprioli & Ricci ont montré que différents paramètres externes pouvaient affecter le taux de survie de bdelloïdes sous forme desséchée, supposée insensible ou presque aux conditions extérieures. La rapidité de la dessiccation, le taux relatif d'humidité ou encore la température sont des paramètres



environnementaux pouvant influencer la survie des bdelloïdes lors de périodes de dessiccation (Caprioli & Ricci, 2001; Boris Hespeels, communication personnelle).

#### 1.4.1.2. Cassures double brin et stress oxydatif

L'anhydrobiose affecte directement l'intégrité du génome des bdelloïdes. Hespeels *et al.* ont en effet démontré par PFGE que des cassures double brin apparaissent après une semaine de dessiccation. De plus, la quantité de DSB augmente au cours du temps passé en état d'anhydrobiose (Figure 21) (Hespeels *et al.*, 2014).

Cette accumulation de DSB pendant la dessiccation a également été observée chez d'autres organismes capables de dessiccation dont certaines espèces de métazoaires. La dessiccation chez la bactérie *Deinococcus radiodurans* induit des DSB et ceux-ci s'accumulent avec le temps passé en état desséché (Mattimore & Battista, 1996). Chez le tardigrade *Milnesium Tardigradum*, il a été aussi montré que les cassures à l'ADN apparaissent progressivement pendant la dessiccation et qu'ils s'accumulent proportionnellement au temps en anhydrobiose (Neumann *et al.*, 2009). Enfin, la larve de l'insecte *Polypedilum vanderplanki* accumulent également des DSB à cause de la dessiccation (Gusev *et al.*, 2010).

Les périodes de dessiccation s'accompagnent d'une augmentation du taux de ROS (*Reactive Oxygen Species*, principalement  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$  et  $H_2O_2$ ) (Kranner & Birtic, 2005; França *et al.*, 2007). En temps normal, la quantité de ROS est contrôlée par différents processus pro- et antioxydants permettant de maintenir un équilibre (Favier, 2003). Hors, pendant la dessiccation, l'organisme diminue peu à peu son contrôle sur ses activités métaboliques. Il a donc été supposé que le taux de ROS n'est alors plus contrôlé et augmente, provoquant alors un stress oxydatif au sein de la cellule (Kranner & Birtic, 2005). L'origine exacte des ROS induits par la dessiccation n'est pas encore connue à l'heure actuelle (França *et al.*, 2007). Les bdelloïdes semblent être dotés de mécanismes antioxydants puissants permettant probablement de diminuer l'impact des ROS sur les protéines, l'ADN et autres structures biologiques. Un des mécanismes de résistance aux ROS est la protection contre la carbonylation. La carbonylation est la formation d'un groupement carbonyle sur certains acides aminés suite à une attaque de ROS. Cette modification est irréversible et rend la protéine inactive (Nyström, 2005). Krisko *et al.* (2012) ont montré que les bdelloïdes *A. vaga* possède un système de protection bien plus efficace que celui de *Caenorhabditis elegans* contre la carbonylation. De plus, le séquençage du génome d'*A. vaga* a permis de détecter un grand nombre de gènes antioxydants, bien plus nombreux que chez les organismes modèles séquencés (Flot *et al.*, 2013).

#### 1.4.2. Types de cassures double brin

Les cassures double brin peuvent être divisées en plusieurs catégories. Cette classification se base sur la gravité de la lésion des dommages induits et de sa complexité. La forme la plus simple de DSB est la coupure de l'ADN provoqué par une enzyme de restriction. L'ADN ne comporte aucune modification chimique, et ces cassures sont théoriquement facilement réparables par simple ligation enzymatique (Figure 14A) (Schipler & Iliakis, 2013).

Le deuxième type de cassure est la cassure directe induite par des radiations ionisantes ou des agents chimiques. Les sucres de la structure de l'ADN peuvent être endommagés au niveau de la cassure (Figure 14B) (Henner *et al.*, 1982, 1983; Schipler & Iliakis, 2013). Avant la religation, l'ADN nécessite donc une étape de réparation (Weinfeld *et al.*, 2011). Les radicaux libres peuvent également créer ce type de cassure double brin. Cependant, les ROS endommagent l'ADN en créant des cassures simple brin. Si deux de ces types de cassures se situent sur des brins opposés à moins de 10 paires de bases l'une de l'autre, cela génère un DSB (Schipler & Iliakis, 2013).

Le troisième type de dommage est également directement induit par des agents physiques tel que les radiations. Cette catégorie est caractérisée par la présence, en plus de celle du DSB, d'autres dommages à l'ADN comme la perte ou la modification de base (Figure 14C). Ce type de dégâts est créé de façon plus importante avec des particules *High LET*, car ces dernières induisent des dommages focalisés ou en cluster (voir *Radiations ionisantes*) (Schipler & Iliakis, 2013).

Les DSB de la quatrième catégorie sont des cassures indirectement provoquées par la machinerie de réparation de la cellule. En effet, la réparation de l'ADN peut nécessiter son ouverture. Si celle-ci se fait en face d'une cassure simple brin déjà formée, c'est alors que le DSB apparaît. (Figure 14D) (Eccles *et al.*, 2011; Georgakilas *et al.*, 2013; Schipler & Iliakis, 2013).

Le cinquième type de DSB est également induit de façon indirecte. Après une irradiation, certains sucres de la structure de l'ADN peuvent être altérés, diminuant alors leur stabilité (Figure 14E). Cette instabilité peut avoir pour conséquence une cassure double brin, parfois plus d'une heure après l'irradiation, si le sucre affecté est proche d'une cassure simple brin (Singh *et al.*, 2011, 2013; Schipler & Iliakis, 2013).

La dernière catégorie reprend les DSB induits en cluster (groupe). La réparation de ces dommages est grandement affectée et ralentie (Johnston *et al.*, 1998) par la perte de la stabilité de la structure de la chromatine (Figure 14F) (Schipler & Iliakis, 2013). La multiplicité des DSB localisés au même endroit peut alors empêcher les voies de réparation des DSB de fonctionner correctement et peut aussi créer des aberrations chromosomiques (ou réarrangements) (Terzoudi *et al.*, 2011).

### **1.4.3. Les radiations ionisantes**

Dans le cadre de ce mémoire, il a été indispensable d'induire facilement et rapidement des cassures dans le génome du rotifère *A. vaga* afin d'étudier l'effet des DSB sur la structure du génome. Les radiations ionisantes permettent de répondre à ce problème car elles peuvent induire d'importantes quantités de DSB en relativement peu de temps (par rapport à la dessiccation). De plus, les radiations ont déjà été utilisées chez des organismes radio-résistants tel que *Deinococcus radiodurans* (Mattimore & Battista, 1996), *Polypedilum vanderplanki* (Gusev *et al.*, 2010), les tardigrades (Horikawa *et al.*, 2006), ainsi que les rotifères bdelloïdes (Gladyshev & Meselson, 2008; Hespeels *et al.*, 2014). Dans la majorité des cas, la radiorésistance est corrélée aux capacités de résistance à l'anhydrobiose. Ce qui suggérerait que les mécanismes qui ont évolué pour permettre à ces organismes de résister à des périodes de sécheresse, leur permettraient également de résister aux effets nocifs des radiations ionisantes.

Les radiations ionisantes sont un terme générique pour désigner tout type de radiations permettant d'ioniser la matière. Parmi ces radiations se classent les particules  $\alpha$ , les particules  $\beta$ , les neutrons, protons (particules), ainsi que les rayons X et  $\gamma$  et les UV entre 100 et 400 nm (photons) (El Ghissassi *et al.*, 2009). Les effets des protons et des rayons  $\gamma$  ont déjà été démontrés chez *A. vava* (Gladyshev & Meselson, 2008; Gladyshev & Arkhipova, 2010; Hespeels *et al.*, 2014). Une irradiation à ces particules induit des cassures double brin et fragmente le génome (Figure 15). La proportion des DSB augmente en fonction de la dose reçue, sans pour autant affecter la survie des bdelloïdes, et cela jusqu'à 800 Gy.

#### 1.4.3.1. Dépôt d'énergie

Les protons (particule, au même titre que les particules  $\alpha$  et  $\beta$  et les neutrons) et les rayons X (photons, au même titre que les rayons  $\gamma$  et les UV entre 100 et 400 nm) déposent leur énergie de façon différente à la matière. Les protons sont des particules chargées possédant une certaine masse, ce qui les ralentit au sein de la cible. A une distance spécifique de la source (dépendante de leur énergie initiale), les protons s'arrêtent. C'est à cet endroit que ces particules vont interagir le plus avec la matière qui les entoure, ce qui signifie que le dépôt d'énergie est maximal (Figure 16) (Wisnbaugh *et al.*, 2014). Les rayons X, au contraire, sont des photons sans masse et sans charge. Ils sont donc arrêtés au fur et à mesure de la distance dans la matière, et l'énergie déposée diminue avec la distance. Néanmoins un pic d'énergie est observé après quelques centimètres. Il s'agit des électrons excités par les rayons qui augmentent l'effet des radiations. Cet effet est ensuite compensé par la diminution de la quantité de photons par absorption (Figure 16) (Wisnbaugh *et al.*, 2014).

#### 1.4.3.2. High- et Low Linear Energy Transfer

Une autre caractéristique importante des radiations est le *Linear Energy Transfer* ou LET (ou transfert linéique d'énergie). Le LET décrit la quantité d'énergie déposée dans la matière traversée par les radiations par unité de distance (Seltzer *et al.*, 2011). Il dépend du type de radiations ainsi que de la matière rencontrée. Le LET peut être divisé en deux catégories (bien que la séparation soit moins claire dans certains cas comme les protons (Dr. Cécile Bopp, communication personnelle)) : élevé (*High LET*) ou faible (*Low LET*). La principale différence entre ces deux catégories est le nombre de particules nécessaires pour induire une certaine quantité d'énergie (Pouget & Mather, 2001; Greubel *et al.*, 2017). Autrement dit, pour une même quantité d'ionisations, il faudra moins de particules *High LET* que de particules *Low LET* (Figure 17).

Les radiations *Low LET* incluent les électrons et les ondes électromagnétiques (ou photons) tels que les rayons X ou  $\gamma$  (Pouget & Mather, 2001). Les radiations *High LET* incluent quant à elles les particules  $\alpha$ , les ions carbone, les protons par exemple et les noyaux plus lourds comme le  $^{56}\text{Fe}$  ou le  $^{20}\text{Ne}$  (Pouget & Mather, 2001; Greubel *et al.*, 2017). Les dégâts induits par des particules *High LET* sont plus localisés autour du trajet de la particule. Si cette dernière rencontre une molécule d'ADN, les dommages seront plus focalisés (parfois appelés *Clustered Damage Site*) par rapport à des particules *Low LET* (Figure 18). Ces dernières génèrent en effet un pattern d'ionisations plus large et plus homogène (Schipler & Iliakis, 2013). Les radiations ionisantes (*Low-* ou *High-LET*) peuvent également induire des DSB indirectement via la formation de ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Kranner & Birtic, 2005). Les ionisations des molécules d'eau



peuvent produire des radicaux libres (radiolyse de l'eau) tels que l'•OH (Azzam *et al.*, 2012; Schipler & Iliakis, 2013). Ces radicaux peuvent induire de lésions au niveau de l'ADN. Le profil d'ionisations induit par les ROS est très homogène (Figure 18). La probabilité que deux dommages soient induits de part et d'autre de l'ADN au même endroit (DSB) est donc plus faible que celle des radiations ionisantes (Schipler & Iliakis, 2013).

Précédemment, les irradiations opérées sur *A. vaga* étaient réalisées à l'aide de protons, d'une énergie de 1,7 MeV et considérés comme *High LET*. Dans le cadre de ce mémoire, ce sont des irradiations aux rayons X qui ont été testées. Tout d'abord, afin de tester les effets de ces radiations sur la survie, la fertilité et l'intégrité du génome d'*A. vaga*. Mais également car les rayons X présentent plusieurs avantages techniques par rapport aux irradiations aux protons. Il est important de noter que dans le cas de hautes doses (plusieurs centaines à milliers de Gray), les différences entre *High-* et *Low LET* sont atténuées à cause de la multiplicité des ionisations provoquées (Dr Cécile Bopp, communication personnelle).

## **1.5. Réparation des DSB**

### ***1.5.1. Cinétique de réparation***

La cinétique de réparation des bdelloïdes *A. vaga* desséchés et irradiés aux protons a déjà été mise en évidence par Hespeels *et al.* en 2014. Chez les bdelloïdes desséchés, les dommages induits par la dessiccation commencent à être réparés dès 2 heures après la réhydratation (Figure 22). La quantité des fragments de petite taille diminue en fonction du temps jusqu'à 48 heures (temps maximal étudié), synonyme d'un processus actif de réparation des DSB. Des fragments d'ADN sont néanmoins toujours observables après ces 48 heures, ce qui suggère que tous les DSB n'ont pas été réparés, ou que des morceaux secondaires suite à la réparation soient présents. Les bdelloïdes desséchés et irradiés avec 800 Gy de protons présentent une cinétique de réparation similaire (Figure 23). La quantité de DSB est toutefois plus importante que chez les individus ayant passé 21 jours en état d'anhydrobiose.

### ***1.5.2. Mécanismes de réparation***

Les cellules végétatives (se répliquant par mitose) possèdent principalement deux types de mécanismes principaux permettant de réparer les cassures double brin: la recombinaison homologue et le *Non-Homologous End-Joining* (ou NHEJ). Les cellules en méiose réparent les DSB par recombinaison homologue entre chromatides sœurs (Seidl & Thomma, 2014).

#### **1.5.2.1. Recombinaison homologue**

La recombinaison homologue se décompose en 3 phases, la pré-synapse, synapse, et post-synapse. Ce mode de réparation de cassures double brin requiert la présence de Rad51 (Krejci *et al.*, 2012). Tout d'abord, les extrémités générées lors d'une cassure double brin sont digérées par le complexe MRX du côté 5' pour former deux extrémités 3' libres (Figure 24) (San Filippo *et al.*, 2008). La protéine Rad51, nom donné chez les mammifères, est ensuite chargée sur ces nouvelles extrémités libres. Pendant la phase synaptique, l'ADN simple brin, aidé par Rad51, va envahir l'ADN double brin au niveau de la séquence homologue. La structure formée s'appelle

un hétéroduplexe ou *D-loop* (Marais, 2003). Enfin, après dissociation de Rad51 pendant la phase post-synaptique, l'ADN est synthétisé par une ADN polymérase sur base de la séquence homologue en utilisant l'extrémité 3' comme amorce (San Filippo *et al.*, 2008; Krejci *et al.*, 2012).

Trois principaux cas de figure existent alors pour résoudre l'hétéroduplexe (Figure 24 A, B et C). Le premier modèle est le *Double-Strand Break Repair* (DSBR) (Figure 24 A). Selon ce dernier, l'autre extrémité 3' (libre) peut être capturée à son tour pour stabiliser l'hétéroduplexe et s'apparier à sa séquence homologue. Il se forme alors 2 jonctions de Holliday. Deux possibilités sont envisageables pour résoudre ces jonctions. Les produits résultant de cette résolution peuvent avoir subi un *crossover* (c'est-à-dire un réarrangement chromosomique) ou bien peuvent ne pas en avoir subi (San Filippo *et al.*, 2008; Mazón *et al.*, 2010; Krejci *et al.*, 2012; McVey *et al.*, 2016). Selon le deuxième modèle, le *Synthesis-Dependant Strand Annealing* (SDSA), le brin nouvellement synthétisé peut se détacher de la séquence homologue et s'apparier à l'autre extrémité 3' (Figure 24 B). Une nouvelle synthèse démarre ensuite, suivie de ligations pour reformer l'ADN double brin. Aucun cross-over ne peut être créé suivant ce modèle. Enfin, selon le *Break-induced replication* (BIR), l'hétéroduplexe peut donner naissance à une fourche de réplication, ayant pour conséquence la copie du chromosome (Figure 24 C) (McVey *et al.*, 2016).

#### 1.5.2.2. Non Homologous End-Joining - NHEJ

L'autre voie de réparation des cassures double brin est le *Non Homologous End-Joining* ou NHEJ. Contrairement à la recombinaison homologue, le NHEJ ne nécessite pas l'intervention de la séquence homologue à la région endommagée. Les extrémités créées lors de la cassure sont rognées et des hétérodimères Ku70/80 s'y lient par la suite (Figure 25) (Hefferin & Tomkinson, 2005). À ce moment, les extrémités peuvent potentiellement se lier entre elles si elles possèdent une région de micro-homologie (1 à 4 nucléotides) (Lieber *et al.*, 2003). La liaison entre les deux extrémités est néanmoins toujours assurée, même si la micro-homologie n'est pas présente, par la liaison des protéines DNA-PKcs, recrutées par Ku70/80 (Lieber *et al.*, 2003; Hefferin & Tomkinson, 2005; Lieber, 2010; Lieber & Wilson, 2010). L'ADN est ensuite ligaturé pour « souder » les deux extrémités.

Le NHEJ est donc un processus non conservatif ne reposant pas sur l'homologie de séquence. Les conséquences de ce type de réparation d'un DSB peuvent être de deux types. Premièrement, des mutations peuvent être induites par l'ajout ou la délétion d'une ou plusieurs bases présentes au niveau de la cassure. Deuxièmement, étant donné que les extrémités ne doivent pas obligatoirement comporter des séquences de micro-homologies, il est dès lors possible que deux extrémités provenant de deux chromosomes différents soient assemblées (Lieber & Wilson, 2010). Cette réparation résulterait alors en un réarrangement chromosomique (Lieber, 2010; Lieber & Wilson, 2010).

### 1.5.3. Efficacité de la réparation

La réparation des cassures double brin induites naturellement (dessiccation) ou artificiellement (radiations ionisantes par exemple) peut engendrer occasionnellement des réarrangements chromosomiques. Argueso *et al.* en 2008 se sont penchés sur ce phénomène chez *Saccharomyces cerevisiae* en irradiant des populations avec 800 Gy de rayons X. La dose de radiation a permis de créer ~250 DSB par cellule diploïde arrêtée artificiellement en phase G<sub>2</sub> (Argueso *et al.*, 2008). Cet arrêt dans le cycle cellulaire avait pour but de permettre une réparation par recombinaison plus efficace que lors des autres phases du cycle (Brunborg *et al.*, 1980). Le génome des levures a été réparé dans sa presque totalité endéans les 3 heures. Ils ont ensuite analysé les chromosomes de plusieurs colonies provenant de cellules ayant survécu à l'irradiation. Ils ont pu observer que près de 2/3 des colonies étudiées présentaient un profil en PFGE différent de celui de la souche de référence (Figure 26) (Argueso *et al.*, 2008). Une étude plus approfondie (analyse du niveau de ploïdie, *Southern Blot*, *Micro-arrays*) de ces modifications génomiques a permis de mettre en évidence la diversité de réarrangements pouvant se produire après induction massive de DSB (délétions, duplications, inversions et translocations, (Figure 27) (Argueso *et al.*, 2008). Les auteurs ont également montré que l'apparition de réarrangements est étroitement liée aux séquences répétées. En effet, 91% des 97 réarrangements observés dans les populations étudiées ont été trouvés au sein de répétitions tels que des rétrotransposons (Figure 27). Leur modèle permettant d'expliquer les réarrangements chromosomiques se base sur le rôle des régions répétées sur la réparation des DSB (Figure 28). Une cassure induite au sein d'une région unique (tel qu'un gène) est majoritairement réparée en utilisant sa séquence homologue, c'est-à-dire son autre copie (présent sur la chromatide sœur, après réplication du génome) ou l'allèle correspondant (=conversion génique). En revanche, quand une cassure est induite au sein d'une région répétée, les séquences homologues sont présentes à plusieurs endroits dans le génome. La résolution des jonctions de Holiday formées lors de la recombinaison homologue (voir Figure 24) peut mener à des réarrangements entre différents chromosomes (Figure 27).

L'apparition de réarrangements dépend également de l'efficacité des mécanismes de réparation. Certaines espèces peuvent réparer fidèlement leur génome après avoir été irradiés à de fortes doses. Chez *Deinococcus radiodurans* par exemple, aucun réarrangement n'apparaît après une irradiation de 5.000 Gy de rayons  $\gamma$  (Figure 29). De plus, la majorité du génome est réparée dans les 3 heures après irradiation (Repar *et al.*, 2010). Ces bactéries radiorésistantes ont dû être irradiées à 25.000 Gy pour pouvoir induire des réarrangements chromosomiques. *D. radiodurans* posséderait un mécanisme de réparation efficace permettant de ne pas induire de réarrangements, et particulièrement au niveau de régions répétées (Blasius *et al.*, 2008; Repar *et al.*, 2010). Ce système efficace serait une voie alternative de la recombinaison homologue, appelé RecFOR (Bentchikou *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2010).

Chez *A. vaga*, l'efficacité de la réparation (et donc l'efficacité des mécanismes sous-jacents) n'a pas encore été bien décrite (Dr. Boris Hespeels, thèse de doctorat, 2016) et pourrait donc influencer l'apparition de réarrangements chromosomiques. Ce mémoire s'est donc intéressé à l'efficacité des mécanismes de réparation chez cette espèce et son impact sur l'intégrité génomique.

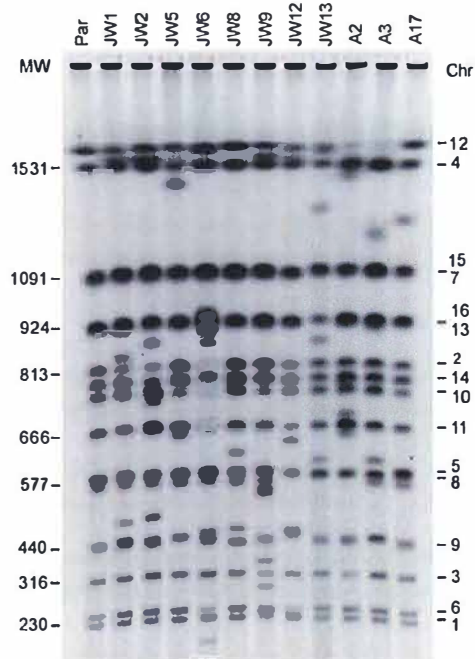


Figure 26 : Caryotype par PFGE différents individus *S. cerevisiae* ayant reformé une population après avoir été irradiés aux rayons X (8000 Gy). Les bandes correspondent aux différents chromosomes non traités ayant migré (pas de traitement par enzyme de restriction). Les numéros des chromosomes sont présents sur la droite du gel (Argueso *et al.*, 2008).

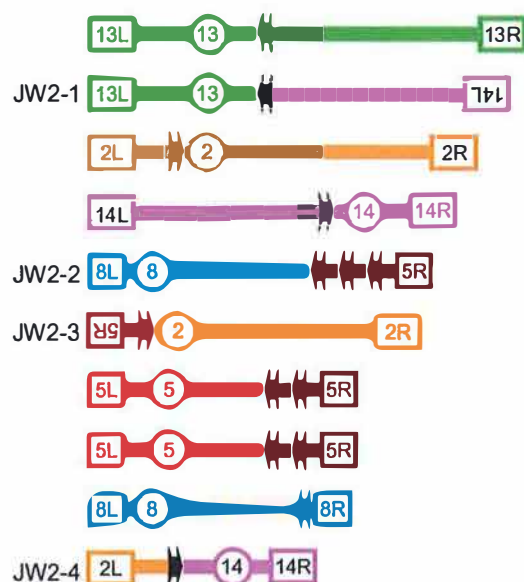


Figure 27 : Représentation schématique des réarrangements chromosomiques d'une lignée clonale (appelée JW2) provenant d'un individu *S. cerevisiae* ayant survécu à 800 Gy de rayons X. Chaque chromosome est représenté dans une couleur. Les cercles correspondent aux centromères des chromosomes. Les télomères sont quant à eux représentés par les rectangles aux extrémités (L = *Left* ou gauche ; R = *Right* ou droite). Les flèches noires représentent les rétrotransposons ainsi que leur régions LTR (*Long Termial Repeats*) (Argueso *et al.*, 2008).



## 1.6. L'environnement spatial

L'environnement spatial est caractérisé par des conditions extrêmes qui ne sont pas retrouvées simultanément sur Terre. Les principales contraintes rencontrées en dehors de l'atmosphère terrestre sont les radiations, le vide, la température et la microgravité. C'est pourquoi, les études en astrobiologie se focalisent sur des organismes extrêmophiles, principalement des procaryotes, capables de survivre dans des conditions inhospitalières pour la plupart des espèces. L'étude de ces organismes extrêmophiles exposés à l'environnement spatial permet de mieux appréhender la possible existence d'une vie extra-terrestre, ainsi que les voyages interplanétaires d'êtres vivants (exobiologie). L'analyse des impacts sur le long terme permet également de fournir des informations utiles dans l'hypothèse d'un voyage humain de plusieurs semaines à plusieurs mois (par exemple vers Mars).

A l'heure actuelle, la presque totalité des études menées en astrobiologie se limite à l'orbite basse terrestre (*Low Earth Orbit* – LEO). Cette orbite s'étend de la surface du sol à 2.000 kilomètres d'altitude (IADC, 2007). Cependant, pour des raisons techniques et économiques, les voyages emportant des échantillons biologiques se limitent à 450 km d'altitude au maximum. Les missions à long terme restent à bord de la station spatiale internationale ou *International Space Station* (ISS) à 350 km (Baglioni *et al.*, 2007).

### 1.6.1. Les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes constituent un des problèmes majeurs limitant la vie dans l'espace. La dose annuelle effective de radiations en LEO est environ 100 fois supérieure ( $\approx 30$  mSv) à la dose reçue sur le sol terrestre (Baglioni *et al.*, 2007). Elles proviennent de différentes sources : des radiations cosmiques, des radiations solaires et des ceintures de van Allen. Les radiations cosmiques et solaires sont principalement constituées de protons, avec un plus faible pourcentage de particules  $\alpha$ , de noyaux lourds et d'électrons. Les ceintures de van Allen sont également une source importante de radiations. Celles-ci, au nombre de deux, sont des zones du champ magnétique terrestre piégeant les particules et électrons des radiations externes. Bien que les satellites ou l'ISS passent la majeure partie du temps en dehors de cette zone, ces objets en orbite traversent fréquemment une zone de la ceinture de van Allen interne au niveau de l'Atlantique sud (*South Atlantic Anomaly* - SAA) (National Research Council, 2000). Il a été estimé que 90% de la dose de radiations reçue par les engins spatiaux proviennent de cette zone (Baglioni *et al.*, 2007). Les Ultraviolets sont également dangereux pour les organismes vivants, et plus particulièrement les UV-C (200-280 nm). L'ADN a en effet un pic d'absorption maximal dans la gamme des UV-C. Quand ceux-ci sont absorbés, des réactions photochimiques peuvent avoir lieu et donc provoquer des mutations si ces dégâts ne sont pas réparés. Sur Terre, les UV-C sont arrêtés par les molécules de l'atmosphère, ce qui n'est pas le cas au niveau de l'ISS (Baglioni *et al.*, 2007). Les radiations sont donc le principal problème pour les astronautes et le principal facteur limitant pour la survie d'organismes dans l'espace (National Research Council, 2000; Baglioni *et al.*, 2007).

### 1.6.2. Le vide et la température

D'autres facteurs de l'environnement spatial peuvent également limiter la survie d'organismes en dehors de l'ISS. La pression atmosphérique au niveau de la station varie entre  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  Pa. Ces valeurs se situent en dessous de la pression nécessaire pour garder de l'eau liquide. Par conséquent, l'eau, si présente, est vaporisée, limitant l'étude des organismes dans l'espace à ceux capables de se déshydrater (par ex. (Persson *et al.*, 2011)) ou à produire des formes résistantes (telle que des spores par ex. (Horneck *et al.*, 2012)) (Baglioni *et al.*, 2007).

Les températures au niveau de l'ISS varient fortement ( $-120^{\circ}\text{C}$  à  $+120^{\circ}\text{C}$ ) et dépendent de la position de l'objet en question par rapport au Soleil. Cependant, la température réelle mesurée au niveau des modules d'exposition des échantillons biologiques à l'extérieur de l'ISS varie de  $-20^{\circ}\text{C}$  à  $+40^{\circ}\text{C}$  selon Rabbow *et al.* (2012). Cette atténuation des fluctuations de température est due au fait que les échantillons sont en partie protégés.

### 1.6.3. La microgravité

La microgravité est probablement le facteur le plus spécifique à l'environnement spatial et le plus difficilement reproductible sur Terre. Au niveau de l'ISS, elle varie entre  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  g, à cause de l'attraction résiduelle de la planète. Les effets de la microgravité sur la réparation des dommages à l'ADN (par exemple induits par les radiations ionisantes) restent controversés. Certaines études ont trouvé que la microgravité diminue la réparation (Kumari *et al.*, 2009), d'autres montrent que les dommages sont mieux réparés (Kobayashi *et al.*, 2004), et enfin certaines affirment que la microgravité n'influence pas la réparation (Mognato & Celotti, 2005). Par conséquent, l'étude de l'impact de la microgravité sur la cinétique de réparation du génome d'*A. vaga* après induction de DSB permettrait de discriminer l'une ou l'autre hypothèse.

A l'heure actuelle, deux dispositifs existent pour simuler la microgravité, le 2D Clinostat et la 3D *Random Positioning Machine* (RPM) (Herranz *et al.*, 2013; Brungs *et al.*, 2016) (Figure 30). Cette dernière a été utilisée dans le cadre des expériences menées en microgravité simulée au sein de ce mémoire. Les effets combinés des radiations et de la microgravité sont encore mal compris et souvent l'objet de résultats contradictoires entre plusieurs études (Kobayashi *et al.*, 2004; Yatagai *et al.*, 2011; Yatagai & Ishioka, 2014). Le principal objectif de ce mémoire concernant la microgravité était donc d'observer un éventuel effet de celle-ci sur la réparation de dégâts à l'ADN produits par une irradiation chez *A. vaga*. Les expériences menées dans le cadre de ce mémoire, en microgravité simulée, s'inscrivent dans le projet ESA nommé RISE (*Rotifers In Space*).

## 2. Résumé des objectifs du mémoire

Les bdelloïdes sont des micro-organismes vivant dans des environnements semi-terrestres et se reproduisant de façon asexuée depuis des millions d'années. L'espèce modèle du laboratoire LEGE, *Adineta vaga*, contient un génome mosaïque avec plusieurs réarrangements. L'origine de ces réarrangements est inconnue, est-ce l'absence d'une méiose conventionnelle depuis des millions d'années ou est-ce la conséquence de la réparation de cassures d'ADN double brin suite à de longues périodes de dessiccation ?

Le but premier de ce mémoire est de comprendre l'impact des cassures double brin (induit par la dessiccation et la radiation) sur la structure du génome du rotifère bdelloïde *A. vaga*. Pour atteindre cet objectif, il a fallu mettre au point et optimiser le protocole des *Pulse Field Gel Electrophoresis* couplées aux profils de restriction afin de visualiser au mieux de potentiels réarrangements.

En lien avec ce premier objectif, ce mémoire s'est également attardé sur l'impact des rayons X sur l'intégrité du génome, la survie et la fertilité de populations de *A. vaga*. Ces expériences ont été réalisées en vue de déterminer si les rayons X peuvent remplacer les irradiations précédemment réalisées par protons. Les irradiations par protons présentent différents désavantages techniques pour l'étude de l'impact des DSB sur le génome de bdelloïdes (besoin de personnel qualifié, irradiation de bdelloïdes uniquement desséchés, *etc.*). La cinétique de réparation des cassures double brin induites par les rayons X a également été testée lors de ce mémoire.

Dans un deuxième objectif, nous avons tenté de déterminer si la microgravité, simulée par une 3D *Random Positioning Machine*, influence la cinétique de réparation des DSB après leur induction massive par irradiations aux rayons X chez le rotifère *A. vaga*.

## **Table des matières Matériel et méthode :**

<b>3.1.</b>	<b>CULTURES DE ROTIFÈRES.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.</b>	<b>COLLECTE DES ROTIFÈRES .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.</b>	<b>DESSICCATION / RÉHYDRATATION.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4.</b>	<b>IRRADIATIONS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5.</b>	<b>ISOLATION INDIVIDUS / FERTILITÉ.....</b>	<b>26</b>
<b>3.6.</b>	<b>SURVIE.....</b>	<b>27</b>
<b>3.7.</b>	<b>MICROGRAVITÉ SIMULÉE .....</b>	<b>27</b>
<b>3.8.</b>	<b>PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS (PLUGS) .....</b>	<b>27</b>
<b>3.9.</b>	<b>DIGESTION ENZYMATIQUE .....</b>	<b>28</b>
<b>3.10.</b>	<b>PFGE ET RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES .....</b>	<b>29</b>

### 3. Matériel et méthodes

Les protocoles et méthodes employées durant ce mémoire sont adaptés de Hespeels *et al.* (2014).

#### 3.1. Cultures de rotifères

Les rotifères *A. vaga* ont été cultivés dans de l'eau de Spa® dans des boîtes de Petri de 14 cm × 2 cm à 21°C. Chaque culture a été nourrie une fois par semaine avec du jus de salade. Il s'agissait d'une salade biologique mixée dans de l'eau Spa® et ensuite autoclavée. La quantité de nourriture dépendait de la densité de la culture ainsi que la densité de la nourriture elle-même. Une à deux fois par mois, les cultures étaient rincées pour éviter la prolifération de contaminations telles que des bactéries ou champignons. L'eau du surnageant était enlevée et remplacée.

#### 3.2. Collecte des rotifères

Des boîtes de cultures denses de *Adineta vaga* ont été mise à jeun pendant 24 heures avant le début de la collecte. La mise à jeun a été réalisée en rinçant la boîte avec de l'eau Spa® afin d'enlever les impuretés et les individus morts. Après ce délai de 24h, 400 µl de NaCl 5M était ajouté afin de détacher une partie des rotifères accrochés en créant un choc osmotique. Chaque boîte a alors été vortexée pendant 10 à 15 secondes. Le liquide a ensuite été transvasé dans un falcon de 15 ml. Tous les falcons obtenus ont été centrifugés 20 minutes à 4°C à 3.220g. Les culots de bdelloïdes ont été rassemblés dans un seul tube ou plusieurs en fonction du volume total. Les centrifugations ont été répétées autant de fois que nécessaire pour n'avoir plus qu'un seul falcon contenant l'ensemble des rotifères collectés.

#### 3.3. Dessiccation / Réhydratation

Afin de permettre la dessiccation des bdelloïdes, des boîtes de dessiccation ont été réalisées. Une boîte de dessiccation à 3% est constituée de 30 ml d'eau de Spa® et de 0.9 g d'agarose *Low Melting Point* (LMP) (LMP UltraPure™ Invitrogen Carlsbad 16520-100). L'agarose a été doucement versé dans l'eau, contenue dans un berlin prévu à cet effet, afin d'éviter la formation de « grumeaux ». Le mélange a ensuite été chauffé au micro-onde (plusieurs fois si nécessaire) afin d'obtenir un liquide totalement transparent. 30 ml de ce dernier ont alors été transvasés dans une boîte de Petri de 10 cm × 1.5 cm. Les boîtes ont été mises à sécher pendant 4h30 sous hotte à flux horizontal. Ensuite, chaque boîte a été hermétiquement fermée à l'aide de Parafilm M® et placées à 4°C la veille de la dessiccation.

Les rotifères collectés ont été placés en deux temps sur les boîtes de dessiccation. Tout d'abord, 250 µl de l'eau contenant les rotifères ont été placés au centre de la boîte. Ensuite, le falcon a été rempli d'eau et vortexé afin de récupérer les rotifères pouvant s'accrocher aux parois. 1 ml de cette eau a été déposé au niveau de la goutte précédemment formée. Le volume total déposé contient approximativement 50.000 bdelloïdes.



Ces boîtes de Petri ont été déposées sans couvercle dans une chambre climatique WEKK 0028 (Voetsch). Les conditions de dessiccation suivantes ont été appliquées : diminution linéaire de l'humidité relative de 70% à 55% en 17h, diminution linéaire de l'humidité relative de 55% à 41% pendant 1h, suivi par une diminution de 41% à 19% en 19h. Après environ 37h, toute l'eau est évaporée laissant l'agarose sec et les bdelloïdes desséchés.

Une fois la dessiccation terminée, les regroupements de rotifères (appelés « patches ») ont été découpés et utilisés pour les expériences. La réhydratation a été réalisée en ajoutant de l'eau de Spa® ~20 ml sur les patches de rotifères. Une heure après l'ajout d'eau, 45 µl de jus de laitue ont été ajoutés.

### 3.4. Irradiations

Les irradiations aux rayons X (RX) ont été réalisées grâce à un irradiateur PXi X-RAD 225 XL au sein du LARN à l'université de Namur. Le débit de dose a été contrôlé avant chaque irradiation afin de calculer au mieux le temps d'irradiation (variables selon les expériences) des échantillons en fonction de la dose souhaitée. Une plaque de glace était en permanence présente en dessous des échantillons afin de limiter au maximum l'augmentation de température, principalement perceptible pendant les longues irradiations. L'énergie était fixée à 225 keV, l'ampérage à 19 mA et la plaque positionnée à 30 cm de la source.

Il a été possible de calculer le nombre de DSB par Gray par Mb après PFGE (voir plus loin). Ce calcul est réalisable en connaissant la taille du génome de 244 Mb (Flot *et al.*, 2013), la taille moyenne des fragments générés par l'irradiation et la dose de radiations :

$$\frac{\left( \frac{\text{Taille totale du génome}}{\text{Taille moyenne des fragments}} \right)}{(\text{Dose} \times \text{Taille totale du génome})}$$

Le calcul peut également être simplifier de la manière suivante :

$$\frac{1}{(\text{Taille moyenne des fragments} \times \text{Dose})}$$

### 3.5. Isolation individus / Fertilité

La fertilité a été définie comme étant la capacité qu'à un individu de restaurer une nouvelle population. Pour compter la mesurée, des isolations de rotifères ont été réalisées dans les 48 heures après la réhydratation pour les bdelloïdes desséchés, ou après l'irradiation pour les bdelloïdes hydratés (60 ou 120). Chaque rotifère a été prélevé individuellement dans 4 µl et placé dans un puit d'une plaque 12 puits. 2 ml d'eau de Spa® ont été ajoutés ainsi que 10 µl ou 45 µl de jus de laitue. La fertilité a été mesurée 14 jours après les isolations.

Trois cas de figure ont été mesurés : présence du rotifère initial, mort, et sans œufs ; présence du rotifère initial, présence d'œufs mais n'ayant pas éclot (un seul individu vivant au sein du puit) ;

Présence des plusieurs rotifères vivants, issus de l'éclosion des œufs pondus par l'individu initial (démarrage d'une nouvelle population). Dans le même temps, le nombre de rotifères a été compté si une population était présente. Chaque culture a été annotée en fonction de sa position du puit et de la boîte multi-puit (par exemple, la population IIIC2 faisait partie de la boîte III, ligne B, colonne 2). La culture de ces populations a été possible par le transfert des bdelloïdes du puit dans une boîte de Petri de 10 cm × 1.5 cm.

### 3.6. Survie

Le comptage de la survie a été réalisé dans les 48 heures après réhydratation de l'échantillon. Une heure après avoir été nourri (voir *Dessiccation / Réhydratation*), le surnageant a été transféré dans une nouvelle boîte afin de séparer les morts (flottants) des vivants (restant accrochés aux paroi). Cette opération a été effectuée plusieurs fois afin de s'assurer d'une bonne séparation des vivants et des morts. Les boîtes ont alors été collectées (voir *Collecte des rotifères*) afin d'obtenir au final deux tubes, l'un contenant les morts, l'autre les vivants. Dans le cas où le nombre de morts était très faible, ces derniers ont été comptés visuellement et extrait de la boîte initiale, avant la collecte.

Afin de réaliser le comptage, le volume des tubes a été ajusté à 2 ml. Après être vortexé, 4 µl ont été prélevés et déposés dans du Technisolve (Ethanol 99% denatured, VWR Prolabo® Chemicals) sous binoculaire. Le nombre de rotifère a ensuite été mesuré manuellement. Six comptages ont été effectués pour chaque conditions. Le nombre moyen a été calculé, puis le nombre total de rotifères contenu dans les 2 ml a été extrapolé (multiplication par 500 de la moyenne). La survie a été calculée comme suit :

$$\frac{(\text{nombre de vivants})}{(\text{nombre de vivants} + \text{nombre de morts})} \times 100$$

### 3.7. Microgravité simulée

Après irradiation, les échantillons desséchés ont été transportés sur glace au SCK•CEN à Mol. La microgravité a été simulée par une 3D *Random Positioning Machine* (ou 3D RPM, voir Figure 30). Chaque patch a été placé dans une flasque de culture cellulaire de 50 ml. Ce dernier a ensuite été rempli au maximum avant fermeture du bouchon afin d'éviter la formation de bulles qui compromettrait la simulation de microgravité. La moitié des flacons était placé sur la machine, et l'autre moitié (contrôles) juste devant cette dernière. La microgravité simulée a été estimée à <0.04g. Les échantillons ont été retirés après différents laps de temps (2, 6, 24, 48, 96, 168 heures ou 10 jours). Les individus ont été récoltés (voir *Collecte des rotifères*) et transportés à nouveau à l'université de Namur.

### 3.8. Préparation des échantillons (Plugs)

Les rotifères nécessaires à la préparation des échantillons sont tout d'abord récoltés (voir *Collecte des rotifères*). Le culot obtenu à la fin de l'opération a été transvasé dans un eppendorf 1.5 ml et rempli d'eau de Spa®. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 16.100g pendant 1



minute 10 à température ambiante. Le surnageant a été retiré et remplacé par 1.5 ml de solution A (50 mM d'EDTA pH 8.0 ; 10 mM de Tris HCl) afin d'effectuer un rinçage. Après avoir à nouveau centrifugé selon les mêmes paramètres, le surnageant a été remplacé par 500 µl de la même solution.

Six comptages ont été réalisés en prélevant 2 µl des 500 µl et en les déposant dans du Technisolve. Le nombre total de bdelloïdes a été calculé sur base de ces 6 comptages. Des volumes contenant approximativement 1.000 individus ont été prélevés. Après une nouvelle centrifugation (14400 rpm pendant 1 minute 10), les échantillons ont été observés au binoculaire afin de les classer selon leur qualité (présences de crasses pouvant gêner la migration de l'ADN, etc.).

Ces volumes ont été mélangés avec de l'agarose fondu Invitrogen® 1% (LMP agarose (LMPA ; NuSieve GTG Lonza (Rockland, ME, USA))) ou d'agarose *Clean Cut* 2% (BioRad®) pour un volume total de 50 µl. Le pourcentage final d'agarose au sein du plug était de 0,5% et les volumes d'agarose fondu nécessaire ont été calculés. Les mélanges échantillon-agarose ont été déposés dans des moules prévus à cet effet. Après polymérisation de l'agarose, les plugs ont été transférés dans 500 µl de Digestion Buffer (pour un échantillon : 207.34 µl d'eau milliQ ; 250 µl de Solution B ; 16.66 µl de N-Lauroylsarcosine sodium salt solution (or sarkosyl, from Sigma®) ; 26 µl de Protéinase K (~20 mg/ml by Thermo Scientific®)). Les plugs ont ensuite été laissés à 4°C pendant 1 heure, puis placés à 56°C pendant 18 heures pour digestion.

Après 18h de digestion, les plugs ont été rincés 3 fois avec du TBE 0.5× (Tris Borate EDTA, BioRad®). Les plugs ont été placés à 4°C pendant 3 heures, et rincés une dernière fois après ce temps d'attente. Après ce dernier, les plugs ont été stockés dans 500 µl d'EDTA pH 8.0 s'ils n'étaient pas utilisés dans la journée.

### 3.9. Digestion enzymatique

Plusieurs enzymes de restriction ont été testées, NotI-HF (*High-Fidelity*), AsiSi, FseI, AscI, SbfI-HF, SgrAI, PspXI, SexAI, MseI, EcoRI (NEB®) et HinfI (Thermo Scientific®) (Tableau 1). Différentes combinaisons de ces mêmes enzymes ont été testées afin d'augmenter le nombre de régions génomiques analysées et donc potentiellement détecter de possibles réarrangements chromosomiques suite à la dessiccation et radiation (AsiSi/FseI ; NotI/FseI ; FseI/AscI/AsiSi ; AscI/NotI/AsiSi ; FseI/NotI/AsiSi ; AscI/AsiSi et NotI/AsiSi). D'autres paramètres ont été testés, comme l'ajout de BSA (*Bovine Serum Albumine* – 10 mg/ml - NEB®) pouvant éventuellement améliorer la résolution des bandes en PFGE, le nombre de rotifères présents dans l'échantillon (500 ou 1.000 individus), ainsi que la position du plug au sein du gel (vertical ou horizontal).

Les échantillons devant être digérés ont été rincés 4 fois au TE (EDTA : 1 mM ; Tris HCl : 10 mM) et mis à 4 °C pendant 30 minutes. Ils ont ensuite été rincés une nouvelle fois au TE. Le mix de digestion a été ajouté (100 µl au total : 0.5 µl d'enzyme, 10 µl de CutSmart (NEB®), 89.5 µl d'eau milliQ si une seule enzyme présente, ou 89 µl si deux présentes). Le temps de digestion était de 18 heures pour NotI-HF, et 4 heures pour les autres enzymes. Après la digestion, les échantillons ont été rincés 4 fois au TBE 0.5×, mis à 4°C pendant 30 minutes,

rincés une fois au TBE, mis à 4°C pendant 15 minutes et enfin rincés une dernière fois au TBE. Les échantillons étaient gardés à 4°C avant d'être placés dans le gel pour la PFGE.

### **3.10. PFGE et réarrangements chromosomiques**

Afin d'observer les cassures double brins, la réparation ou de possible réarrangements chromosomiques, une PFGE a été réalisée avec les échantillons. Deux machines ont été utilisées, la CHEF MAPPER et la CHEF DRII (BioRad®).

Les échantillons en plug ont été placés dans un gel à 0,5, 0,8 ou 1% d'agarose (LMPA, TBE 0,5×). L'ADN présent dans le gel a été marqué au SYBR Gold (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) et scanné par une caméra XRS BioRad Chemidoc. Le programme de quantification ImageLab 3.0 et ImageJ ont été utilisés pour traiter les images.

Les paramètres de migration ont été basés sur Hespeels *et al.* 2014 pour la CHEF MAPPER, et adaptés pour la CHEF DRII. Les paramètres de base étaient les suivants : Voltage : 190 V pour la CHEF DRII, ou 4.5 V/cm pour la CHEF MAPPER ; Temps de migration : 22 heures ; Intervalle initial : 60 secondes ; Intervalle final : 185 secondes. Ces paramètres ont été modifiés pour certains gels.

Le Schéma 1 reprend le protocole expérimental utilisé pour l'expérience des réarrangements chromosomiques.

## Tables des matières Résultats :

<b>4.1.</b>	<b>PROTOCOLE DE STOCKAGE DES BDELLOÏDES .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2.</b>	<b>IMPACT DES RAYONS X SUR LA SURVIE, LA FERTILITÉ ET L'INTÉGRITÉ DU GÉNOME</b>	<b>31</b>
4.2.1.	SURVIE ET FERTILITÉ .....	31
4.2.2.	INTÉGRITÉ DU GÉNOME.....	32
<b>4.3.</b>	<b>CINÉTIQUE DE RÉPARATION DE L'ADN .....</b>	<b>34</b>
4.3.1.	CINÉTIQUE JUSQU'À 7 ET 42 JOURS.....	34
4.3.2.	CINÉTIQUE ET ENZYME DE RESTRICTION.....	34
<b>4.4.</b>	<b>EFFETS DE LA MICROGRAVITÉ SIMULÉE SUR LA CINÉTIQUE DE RÉPARATION.....</b>	<b>35</b>
4.4.1.	CINÉTIQUE EN MICROGRAVITÉ SIMULÉE .....	35
4.4.2.	COMPARAISON DES CINÉTIQUES DE RÉPARATION.....	36
<b>4.5.</b>	<b>MISE AU POINT DES PROFILS DE RESTRICTION ENZYMATIQUE .....</b>	<b>36</b>
<b>4.6.</b>	<b>RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES .....</b>	<b>39</b>
4.6.1.	DIGESTION PAR NOTI .....	39
4.6.2.	DIGESTION PAR ASiSi/NOTI .....	39
4.6.3.	DIGESTION PAR SBF1 -HF .....	40
4.6.4.	DIGESTION PAR SGRA1 .....	40

## 4. Résultats

### 4.1. Protocole de stockage des bdelloïdes

Afin d'établir une méthode efficace pour stocker les bdelloïdes sans induire de DSB (voir *M&M*), deux méthodes de congélation ont été testées. Tout d'abord, des rotifères hydratés ont été congelé rapidement dans de l'azote liquide. Ces individus ont ensuite été placés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Un autre test consistait à congeler des rotifères en les plaçant directement à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Après 1 jour de stock, les échantillons ont été décongelés pour réaliser des plugs. L'intégrité du génome a alors été observée par PFGE et comparée avec des rotifères hydratés « frais ». Le dernier test a été réalisé avec des échantillons congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 18 jours.

Dans la première expérience (Figure 31 A), le contrôle positif est un plug contenant 1000 individus *A. vaga* dont le génome a été fragmenté par irradiation aux protons (voir Hespeels *et al.*, 2014). Chaque plug contenait approximativement 1.000 individus, les échantillons sont ensuite analysés par PFGE.

Le génome de *A. vaga* contient 12 chromosomes similaires (karyotype Julie Virgo) d'environ 20 Mb. Cette taille de fragment ne peut être observée avec la résolution de la PFGE (entre 225 et 2.200 kb). Comme attendu, l'ADN de l'échantillon contrôle reste dans le plug (Figure 31 puits n°2 et 5). Les bdelloïdes irradiés présentent quant à eux un smear de fragments allant de 225 à environ 1.125 kb (Figure 31 puit n°8). De la même manière que les plugs contrôles, aucun fragment n'est observé après migration de l'ADN des individus congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  et ceux congelés à l'azote liquide. Les plugs en haut du gel de ces deux conditions présentent un signal tel que le contrôle, ce qui signifie que l'ADN n'a pas migré. Dans un second temps, les bdelloïdes congelés 18 jours ont été analysés suivant le même protocole. Il apparaît que ces individus ne présentent pas de cassures, au même titre que les bdelloïdes hydratés.

### 4.2. Impact des rayons X sur la survie, la fertilité et l'intégrité du génome

Les rotifères bdelloïdes *Adineta vaga* desséchés ont précédemment été décrit comme accumulant des DSBs lors d'une exposition croissante à des protons (0-800Gy (Hespeels *et al.*, 2014)). Malgré les nombreuses cassures induites au niveau du génome, la survie des organismes irradiés n'était pas affectée. Dans le cadre de ce mémoire, l'impact de doses croissantes de rayons X sur des rotifères desséchés et hydratés a été étudiée. L'impact a été évalué sur la survie, la fertilité et l'induction de DSBs.

#### 4.2.1. Survie et fertilité

L'impact des rayons X sur la survie de *A. vaga* desséchés et hydratés a été évalué dans les 48h après réhydratation (Figure 32). Ces individus ont été irradiés à des doses croissantes de 0 à 2.000 Gy pour la condition desséchée ou de 0 à 1.500 Gy pour la condition hydratée. Il apparaît que les rayons ne modifient pas la survie d'*A. vaga*. Les individus desséchés présentent un taux de survie proche de 100% quelle que soit la dose reçue (Figure 32 A). (0 Gy : 99,8%, 500 Gy : 98,7%, 1.000 Gy : 98,8%, 1.500 Gy : 99,5%, 2.000 Gy : 99,6%). De manière similaire (Figure 32



B), *A. vaga* hydratés présentent un taux de survie proche de 100% (0 Gy : 99,9%, 500 Gy : 99,4%, 1.000 Gy : 99,3%, 1.500 Gy : 99,4%,) (Dr. Véronique Baumle, données non publiées).

La fertilité (capacité qu'à un individu de restaurer une nouvelle population) a ensuite été évaluée chez des individus *A. vaga* desséchés et irradiés (0-2.000 Gy) et chez *A. vaga* hydratés (0-2.500 Gy) (Figure 33). A 48h après irradiation et réhydratation, 60 individus desséchés ou hydratés choisis aléatoirement ont été isolés indépendamment dans des plaques 12 puits. La présence d'une nouvelle population, d'œufs non-éclos ou d'un individu mort a été observée 14 jours après l'isolation (voir M&M). La fertilité en fonction de la dose suit un même motif pour les deux conditions. Elle est élevée pour les individus desséchés ou hydratés à 0 Gy (97,7 et 80% respectivement) tel qu'attendue, et légèrement plus faible à 500 Gy (90 et 71% respectivement) (Figure 33 A et B). À des doses plus élevées, la fertilité est extrêmement faible voire nulle (fertilité nulle à 2.000 Gy pour les bdelloïdes desséchés et 1.500 Gy pour les bdelloïdes hydratés) (les données sur la fertilité des bdelloïdes hydratés ont été récoltées par Dr. Véronique Baumle, données non publiées).

Dans un deuxième temps, la taille moyenne des populations provenant d'individus *A. vaga* desséchés, irradiés et fertiles a été mesurée 14 jours après l'isolation (Figure 34). Deux conditions ont été testées. Les individus *A. vaga* ont été soit nourris avec peu de nourriture (10µl de jus de laitue), ou avec une grande quantité de nourriture (45 µl) juste après leur isolation. La taille moyenne des populations suit un motif similaire entre les deux conditions. Elle est plus élevée chez les individus contrôles (0 Gy) et diminue en fonction de la dose. Cependant, le nombre de bdelloïdes diffère pour la condition contrôle  $6 \pm 4,6$  dans laquelle les bdelloïdes ont été peu nourris et  $95,2 \pm 46,3$  pour les bdelloïdes nourris avec 45 µl. Des tests statistiques montrent que la taille des populations des bdelloïdes irradiés (quelle que soit la dose) sont significativement différentes de la taille moyenne des bdelloïdes contrôles (*Annexe I*).

#### **4.2.2. Intégrité du génome**

La présence de cassures double brin au sein du génome de bdelloïdes *A. vaga*, hydratés ou desséchés, a été évaluée par PFGE (Figure 35). Le but était de valider la présence de DSB et l'augmentation de ceux-ci en fonction de la dose par irradiation aux rayons X (comme observé précédemment avec une irradiation aux protons (Hespeels *et al.*, 2014)). Chaque échantillon contenait environ 1.000 individus.

Des échantillons desséchés exposés ou non à des doses croissantes de rayons X ont été analysés (Figure 35 A). Les bdelloïdes non irradiés ne présentent pas de DSB au sein du gel après migration (Figure 35 A puit n°2). Des bdelloïdes desséchés 1 jour ne présentent pas de smear dans le gel tel qu'observé par Hespeels *et al.* (2014). Après une irradiation de 100 Gy, des DSB sont visibles par la présence d'un smear allant de 225 à 2.200 kb. De gros fragments sont également observés aux alentours de 2.200 kb. Plus la dose de rayons X augmente, plus la proportion des fragments d'ADN augmente et la taille de ceux-ci diminue. À 1.000 et 1.500 Gy, la taille moyenne des fragments est d'environ 410 kb.

En ce qui concerne les bdelloïdes hydratés (Figure 35 B), les individus non irradiés ne présentent qu'un faible signal vers 2.200 kb. Un smear de 225 à 2.200 kb est observé chez tous les échantillons irradiés. La proportion des fragments courts d'ADN augmente et la taille moyenne de ceux-ci diminue. À 1.500 Gy, la longueur moyenne de ces fragments est d'environ 230 kb.

### 4.3. Cinétique de réparation de l'ADN

#### 4.3.1. Cinétique jusqu'à 7 et 42 jours

Le but de la première expérience était d'étudier la cinétique de réparation de bdelloïdes desséchés 1 jour et irradiés à 500 Gy de rayons X (Figure 36). Cette dose induit  $\sim 0,003 \text{ DSB.Gy}^{-1}.\text{Mb}^{-1}$  et a peu d'impact sur la survie ou la fécondité. Les bdelloïdes ont été fixés à différents moments après réhydratation (2, 6, 24, 48, 96 et 168h).

L'analyse du gel de la cinétique endéans les 168h (7 jours) montre tout d'abord que le plug contrôle ne présente pas de fragments d'ADN (Figure 36 puit n°2). Le plug contenant les individus irradiés à 500 Gy et directement collectés présente quant à lui des fragments allant de moins de 225 à  $\sim 2.200 \text{ kb}$ . Un smear de taille comparable est également observé pour les autres conditions mais l'intensité diminue progressivement en fonction du temps (Figure 36 puits n°4 à 9). La quantité des fragments de grande taille ( $> 2.200 \text{ kb}$ ) augmente et la proportion de fragments plus petits (entre 225 et  $2.200 \text{ kb}$ ) diminue. Après 1 semaine (168 heures), les fragments de 225 à  $2.200 \text{ kb}$  sont toujours présents dans le gel, tel qu'observé par Hespeels et al. (2014) avec les radiations protons.

La deuxième expérience avait pour but d'analyser la cinétique de réparation 1, 7, 14, 28 et 42 jours après la réhydratation (Figure 37). Après 7 jours, certains œufs pondus ont pu donner naissance à la génération suivante. Par conséquent le génome des descendants est inclut dans l'analyse. La cinétique de réparation a été réalisée par PFGE. De plus des échantillons contrôle (bdelloïdes hydratés et non irradiés) ont été ajoutés. Les bdelloïdes hydratés (contrôle) ne présentent pas de cassures double brin. Les autres conditions présentent toutes des fragments d'ADN allant de 225 à  $2.200 \text{ kb}$ . Aucune différence significative n'est observable entre 1 et 42 jours après réhydratation.

#### 4.3.2. Cinétique et enzyme de restriction

Pour évaluer l'efficacité de la réparation, des individus *A. vaga* desséchés et irradiés à 500 Gy de rayons X ont été digérés par NotI. Ces bdelloïdes ont pu réparer leur génome pendant 8, 24, 48 ou 96h. Une PFGE a été réalisée afin de faire migrer les fragments d'ADN. Des bdelloïdes hydratés contrôles et digérés ont été ajoutés pour comparer le profil de restriction à la souche de laboratoire.

En comparaison avec les bdelloïdes hydratés, l'échantillon irradié présente un smear de fragments allant de 225 à  $1.125 \text{ kb}$  (Figure 38 puits n°2 et 3). Les dégâts induits par l'irradiation aux rayons X affectent le profil de restriction par NotI car aucune bande n'est détectable. Huit heures après la réhydratation, une augmentation du signal aux alentours de  $2.200 \text{ kb}$  est observable, en plus de la diminution de la quantité de fragments plus courts (225 à  $1.125 \text{ kb}$ ). Les bandes produites par NotI sont à nouveau détectables mais le bruit de fond diminue leur résolution. Ces bandes sont localisées à 440, 680,  $1.150$  et  $1.500 \text{ kb}$  (Figure 38 puit n°4). Après 96h, il est possible d'observer une nouvelle bande aux alentours de  $260 \text{ kb}$ . Le bruit de fond



important empêche de déterminer si la réparation permet de restaurer un profil de restriction par NotI identique à celui des bdelloïdes hydratés.

#### **4.4. Effets de la microgravité simulée sur la cinétique de réparation**

Les expériences menées sous microgravité simulée (*simulated microgravity* ou Sim0g) avaient pour but de répondre à 3 objectifs principaux. Tout d'abord, est-il possible de réhydrater des rotifères sous microgravité sans affecter leur survie et leur reproduction ? Deuxièmement, la microgravité affecte-t-elle la réparation de l'ADN après une induction massive de cassures double brin ? Enfin, y a-t-il une différence entre la réparation du génome entre les rotifères réhydratés en conditions normales (1g) ou en microgravité ?

Basé sur les résultats de la cinétique de réparation après exposition aux rayons X, les rotifères ont été irradiés à 800 Gy afin d'observer une réparation d'ADN plus importante qu'à 500 Gy.

##### **4.4.1. Cinétique en microgravité simulée**

Deux expériences ont permis de répondre aux questions posées sur la réparation de l'ADN. La première a été réalisée sur des individus irradiés à 800 Gy de rayons X et réhydratés sous microgravité (valeur réelle enregistrée : 0,04g) pendant 168 heures au maximum (Figure 39). Les échantillons ont été irradiés et transportés dans un conteneur réfrigéré à Mol au SCK•CEN. Un échantillon contrôle supplémentaire a été ajouté pour confirmer que le transport des bdelloïdes desséchés n'induisait pas de DSB (Figure 39 puits n°3).

Il a été observé que les bdelloïdes peuvent être réhydratés en microgravité, et que leur survie est comparable à la survie de ceux placés en 1g (~100% de survie) (observation personnelle). Cependant, la majorité des rotifères ne pouvait plus pondre d'œufs viables après l'irradiation (que ce soit à 1g ou 0g). Les échantillons ont été fixés à Mol et une PFGE a été réalisée après leur retour à l'université de Namur.

Les bdelloïdes hydratés et les bdelloïdes desséchés mais non irradiés ne présentent pas de cassures à 0g (Figure 39 puits n°2 et 3). Chez les individus irradiés à 800 Gy en revanche, des fragments allant de 225 à 1.125 kb sont observables à 0g (Figure 39 puits n°4). Jusqu'à 48h de réhydratation en 0g, la proportion des fragments courts diminue en fonction du temps, et la proportion des fragments longs aux alentours de ~2.200 kb augmente (Figure 39 puits n°5 à 8). À 96 et 168h, plus aucune différence n'est détectée.

#### 4.4.2. Comparaison des cinétiques de réparation

La deuxième expérience avait pour but de comparer, sur le même gel PFGE, la cinétique de réparation d'individus desséchés et réhydratés en 1g ou en microgravité simulée (2, 6 et 24 heures après réhydratation) (Figure 40). Comme précédemment, aucun des deux échantillons contrôles ne présentent de DSB (Figure 39 puits n°2 et 3). Un smear de fragments est observable entre <225 kb et ~1.125 kb pour les individus irradiés à 800 Gy. La proportion des fragments courts d'ADN diminue en fonction du temps, à la fois en condition 1g et en microgravité. La bande 800 Gy 0G +2h semble être décalée vers le haut par rapport à la bande 800 Gy 1G +2h (Figure 40 puit n°6). Dans tous les puits, le signal de gros fragments est présent à ~2.200 kb, alors que pour le puits n°6, le signal se situe plus haut (Figure 40 puit n°6 par rapport à tous les autres puits). Ce décalage est également observable avec le profil informatique. Aucune autre différence n'est observable dans les autres conditions et la microgravité ne semble pas influencer la réparation.

#### 4.5. Mise au point des profils de restriction enzymatique

Dans le but de pouvoir observer de possibles réarrangements chromosomiques au sein du génome d'*Adineta vaga* après induction de DSBs, il a été nécessaire de développer une méthode précise et reproductible. Les profils de restriction, basés sur une digestion par l'enzyme NotI couplé à une PFGE, ont déjà été optimisés par Boris Hespeels (thèse de doctorat, 2016). Dans ce mémoire, de nouveaux profils de restriction couplés à la PFGE ont été testés dans le but de visualiser différentes régions génomiques. Le but principal était d'obtenir un maximum de bandes distinguables les unes, couvrant différentes régions génomiques.

Différents paramètres, pouvant potentiellement améliorer la résolution des gels PFGE, ont été testés. Chaque échantillon contient de l'ADN de *A. vaga* gardé constamment hydratés. La taille des bandes produites par digestion avec des enzymes de restriction a été estimée en se basant sur le *ladder* déposé au sein de chaque gel. Ce *ladder* est constitué des chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* (taille : 225, 285, 365, 610, 680, 750, 785, 825, 945, 1.020, 1.125, 1.600 et 2.200 kb).

Après le processus d'optimisation, 4 enzymes ou combinaisons d'enzymes ont été choisies : NotI, AsiSi/NotI, SbfI et SgrAI (Figure 41). Les plugs d'agarose contenaient chacun  $\pm 1.000$  individus hydratés. Pour chaque digestion, deux à trois plugs ont été utilisés afin de confirmer la reproductibilité de la méthode. Le Tableau 2 reprend l'ensemble des paramètres de digestion et de migration.

Enzymes	Voltage	Switch time	Agarose LMP	Temps de digestion
NotI-HF	5,5V/cm	50-150s	1%	16h
AsiSi/NotI	190V	60-185s	0,8%	4h
SbfI-HF	5,5V/cm	50-150s	1%	4h
SgrAI	5,5V/cm	50-150s	1%	4h

Tableau 2 : Paramètres de digestion et de migration optimisés pour chaque enzyme ou combinaison d'enzymes.

Pour l'optimisation par NotI, deux étapes ont été réalisées. Premièrement, les fragments d'ADN étaient séparés suivant un protocole PFGE ne permettant que la séparation des fragments longs (>1.000 kb) (Figure 41, gel de gauche). Un deuxième protocole destiné à séparer plus efficacement les fragments plus courts (<1.000 kb) a ensuite été appliqué (*Switch time* de 50-150s à la place de 60-185s, pourcentage d'agarose à 1% à la place de 0,8% - Figure 41 A, gel de droite). De plus, un autre type d'agarose (*Clean Cut* à la place de l'agarose Invitrogen®) a été testé, permettant une visualisation d'un nombre plus important de bandes. Un total de 11 bandes sont observables entre 225 et 2.200 kb (approximativement à ~225, 285, 300, 365, 400-500, 650, 730, 900, 1.050, 1.250 et 1.600 kb) (Figure 41 A, gel de droite).

Trois plugs digérés par la combinaison AsiSi/NotI pendant 4h ont été soumis à un protocole de migration différent (Figure 41 B et Tableau 2). Un motif similaire de 13 bandes discrètes est observable pour chaque échantillon. Ces bandes se localisent approximativement à 230, 300, 330, 400, 500, 610, 750, 825, 1.100, 1.050, 1.200, 1.400 et 1.500 kb.

Deux plugs d'individus hydratés ont été digérés par SbfI pendant 4h et présentent 19 bandes allant de 225 à 2.200 kb (environ 225, 280, 350, 370, 450, 530, 650, 700, 775, 785, 800, 850, 940, 1.000, 1.050, 1.125, 1.200, 1.350 et 1.500 kb) (Figure 41 C).

Finalement, la dernière enzyme est SgrAI et permet de produire un profil de restriction avec 13 bandes (aux alentours de 320, 420, 500, 600, 680, 720, 770, 800, 900, 1.020, 1.125, 1.350, 1.450 kb) (Figure 41 D).

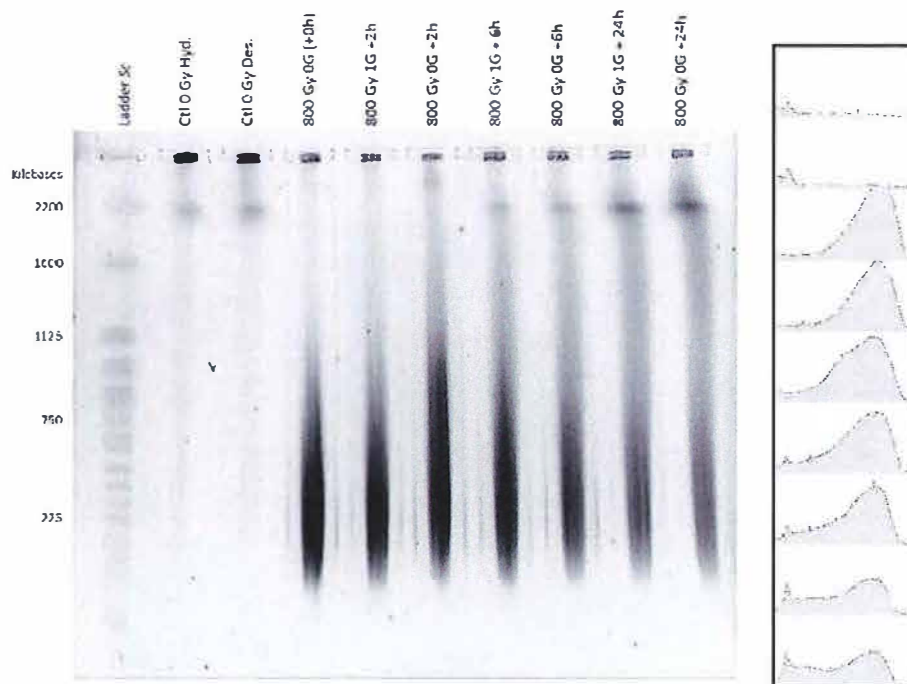


Figure 40 : Cinétique de réparation de 1.000 bdelloïdes *A. vaga* desséchés un jour et réhydratés en microgravité simulée (0G) ou en gravité normale (1G) après exposition à 800 Gy de rayons X. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Le temps de migration était de 22h à 190 V avec un temps d'impulsion variant de 60 à 185s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 0,8%. Le deuxième puit correspond aux bdelloïdes desséchés un jour mais non-irradiés (contrôle), ce puit ne présente pas de DSB. Le deuxième puit correspond aux individus desséchés un jour et transportés jusqu'à Mol (contrôle transport). Les autres puits correspondent aux individus irradiés 2, 6 et 24h après réhydratation en microgravité simulée ou en gravité normale. Après chaque temps, la réparation de l'ADN a été bloquée en fixant les échantillons et les congelant à -80°C.



## 4.6. Réarrangements chromosomiques

Le but principal de cette expérience était de savoir si des réarrangements chromosomiques se produisent après avoir induit massivement des cassures double brin chez *Adineta vaga*. Pour cela, des bdelloïdes desséchés ont été exposés à une dose de 500 Gy de rayons X afin de fragmenter le génome (Figure 35) tout en maintenant une fertilité importante (voir *Résultats – Survie et fertilité*, et *Discussions*) (Figure 33). Huit à seize de ces populations (en fonction du test de restriction) ont pu être analysées par la méthode des profils de restriction couplé à la PFGE. Chaque gel contenait également un plug de bdelloïdes non irradiés, qualifié de « contrôle » car représentant la souche d'*A. vaga* maintenue constamment hydratées au laboratoire. Pour 2 des 4 tests réalisés, des bdelloïdes provenant de l'Antarctique (*Adineta editae*, N. Iakovenko, B. Hespeels, communication personnelle) ont été ajoutés afin de les comparer à la souche du laboratoire et aux lignées clonales. Cet ajout a été réalisé afin de comparer la structure génomique de souches du genre *Adineta*, phylogénétiquement proches mais vivant à des endroits différents. Quatre enzymes/mix d'enzymes ont été testées, NotI (18h de digestion), AsiSi/NotI (4 heures), SbfI (4 heures) et SgrAI (4 heures) (voir M&M et Tableau 2). Les temps de digestion ainsi que les paramètres de la PFGE ont été optimisés par la série de tests préliminaires.

### 4.6.1. Digestion par NotI

La première analyse s'est basée sur la digestion des échantillons par NotI pendant 18 heures (Figure 42 A et B). Le puit n°2 (population II A1) contient un échantillon produit avec de l'agarose Invitrogen® produisant un profil de restriction différent. Cette population II A1 présentent des bandes à 225, 280, 365, 400-490, 610, 680, 740, 850 et 1.200 kb (Figure 42 puit n°2). Tous les autres échantillons présentent 7 bandes discrètes similaires au dernier plug contenant des bdelloïdes hydratés et non irradiés (Figure 42 puit n°10). Ces dernières vont de 225 à 2.200 kb et se localisent plus précisément à 430, 520, 620, 770, 850, 1.050 et 1.200 kb. Le clone II B3 (puits n°3) présente les mêmes bandes, exceptée celle à 1.050 kb.

### 4.6.2. Digestion par AsiSi/NotI

Après avoir testé la digestion par NotI seule, les plugs ont été digérés par AsiSi et NotI pendant 4 heures (Figure 43). Le puit n°2 (II A1) contient un plug réalisé avec de l'agarose Invitrogen®, ce qui a pour conséquence de produire un profil de restriction différent. Les bandes détectables pour cette lignée sont localisées approximativement à 250, 400, 500, 610, 770, 800-850, 1.050-1.100, 1.200, 1.300 et 1.500 kb (Figure 43 puit n°2). Le puit n°6 quant à lui contient un échantillon ne présentant pas de bandes après migration. Ce dernier n'est donc pas analysable et est probablement dû à un problème de digestion. Le motif de migration des différentes lignées clonales est similaire à celui des bdelloïdes hydratés. Les bandes observées vont de 225 à 2.200 kb et sont plus précisément localisées à 250, 285, 350, 400, 500, 610, 770, 825, 1.050, 1.100, 1.200, 1.300 et 1.500 kb.

#### **4.6.3. Digestion par *SbfI*-HF**

Dans un troisième temps, 15 lignées clonales et une lignée de l'Antarctique ont été digérées par *SbfI* pendant 4 heures. Aucun problème de migration n'est observable (Figure 44 A et B). Les différentes lignées clonales présentent un motif similaire de bandes discrètes entre 225 et 2.200 kb avec les bdelloïdes hydratés. Ces bandes sont situées approximativement à 225, 280, 350, 370, 450, 530, 650, 700, 775, 785, 800, 850, 940, 1.000, 1.050, 1.125, 1.200, 1.350 kb (Figure 44 A puits n°2 à 10, Figure 44 B puits n°3 à 10). Les bdelloïdes de l'Antarctique (Figure 44 B puit n°2) présentent un profil différent des autres clones testés. Les bandes varient également entre 225 et 2.200 kb mais se situent à 230, 270, 400, 500, 600, 700, 750, 825, 900-950, 1.100, 1.125, 1.350-1.450 et 1.600 kb.

#### **4.6.4. Digestion par *SgrA1***

La dernière enzyme testée était *SgrA1* pour une digestion de 4 heures (Figure 45 A et B). Aucun plug ne présente de problème de migration. Les bandes observées se situent entre moins de 225 et 2.200 kb. La proximité des bandes aux alentours de 225 kb empêche leur distinction. Tous les échantillons présentent un motif similaire de bandes par rapport aux bdelloïdes hydratés. Ces dernières sont localisées à 320, 420, 500, 610, 680, 720, 770, 800, 900, 1.020, 1.125, 1.200, 1.350 et 1.450 kb (Figure 45 A puits n°2 à 10, Figure 45 B puits n°3 à 10). L'échantillon des *A. editae* de l'Antarctique (Figure 45 B puit n°2) présente un motif dissimilaire par rapport aux autres échantillons. Les bandes distinguables se situent à 500, 780, 980, 1.150 et 1.500 kb.

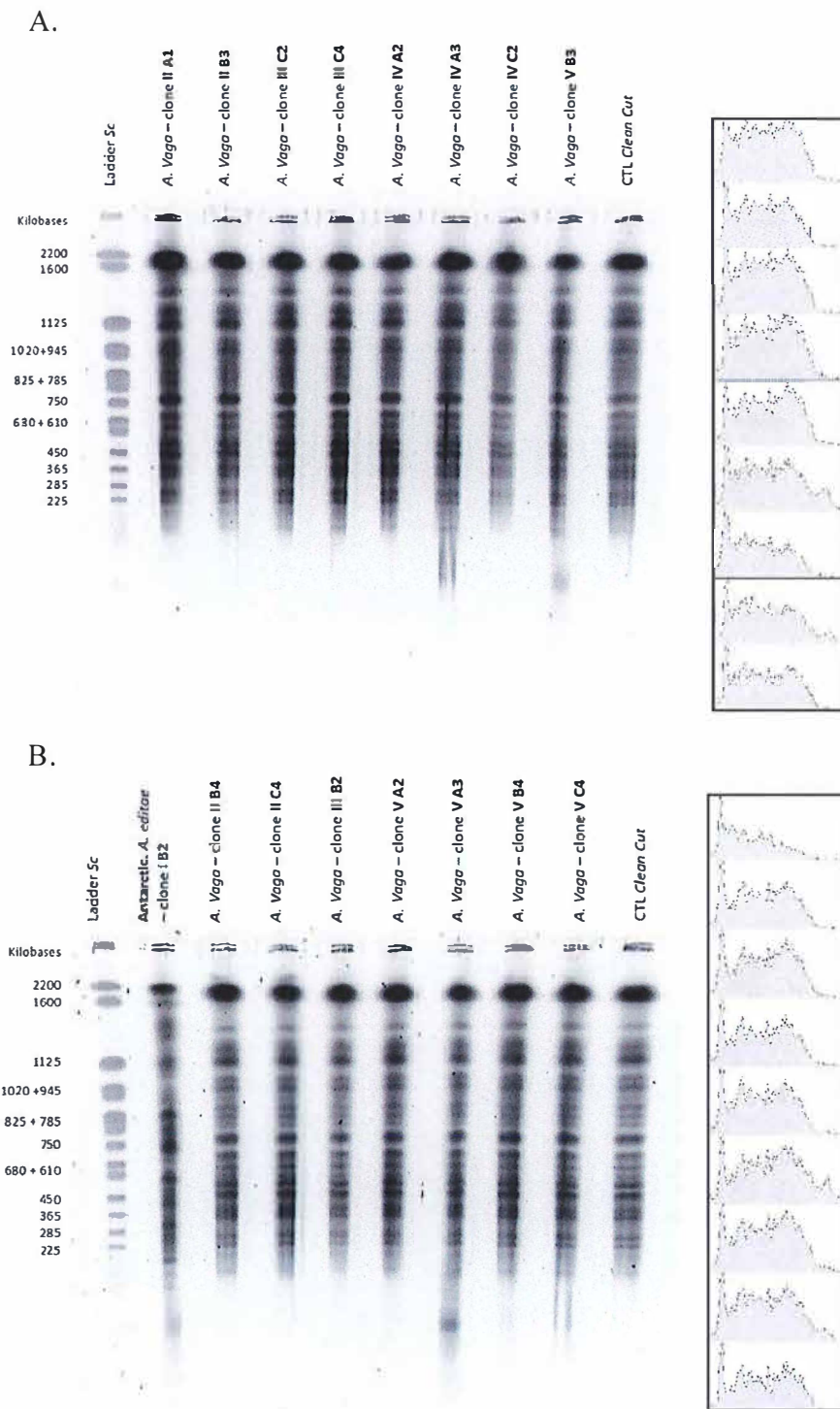


Figure 44 : Profils restriction par SbfI-HF de 15 lignées clonales d'individus *A. vaga* survivants ayant été desséchés et irradiés à 500 Gy de rayons X. Chaque échantillon provient d'une population générée à partir d'un bdelloïde isolé. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 5,5V/cm avec un temps d'impulsion variant de 50 à 150s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 1%. Le temps de digestion était de 18h. Tous les échantillons ont été produits avec de l'agarose *Clean Cut*. (B) Le puit n°2 correspond au profil de restriction de bdelloïdes *A. editae* provenant d'Antarctique.

## **Table des matières Discussion :**

<b>5.1.</b>	<b>LE STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS N'INDUIT PAS DE DSB .....</b>	<b>43</b>
<b>5.2.</b>	<b>LES RAYONS X DIMINUENT LA FERTILITÉ, INDUIT DES DSB MAIS NE DIMINUE PAS LA SURVIE .....</b>	<b>44</b>
5.2.1.	SURVIE ET FERTILITÉ .....	44
5.2.2.	INTÉGRITÉ DU GÉNOME.....	45
<b>5.3.</b>	<b>LA CINÉTIQUE DE RÉPARATION N'EST PAS AFFECTÉE PAR LA MICROGRAVITÉ.....</b>	<b>47</b>
<b>5.4.</b>	<b>MISE AU POINT DES PROFILS DE RESTRICTION ENZYMATIQUE.....</b>	<b>48</b>
<b>5.5.</b>	<b>PAS DE RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES APRÈS INDUCTION DE DSB.....</b>	<b>49</b>



## 5. Discussions

Les rotifères bdelloïdes sont des organismes asexués possédant un génome incompatible avec toute méiose classique et existent sur Terre depuis des millions d'années (Poinar & Ricci, 1992). Cependant, les forces évolutives ayant permis cette survie sur le long terme (supposée impossible) ne sont pas encore connues. Le séquençage du génome d'*Adineta vaga* a permis de confirmer l'existence de deux d'entre elles, les conversions géniques et les transferts horizontaux de gènes. La troisième hypothèse émise est celle des réarrangements chromosomiques pouvant être induits lors d'erreur de réparation de cassures double brin. Précédemment décrit chez *V. dahliae* comme moteur de l'évolution de cette espèce asexuée (De Jonge *et al.*, 2013), les réarrangements permettraient d'expliquer en partie l'évolution des bdelloïdes, ainsi que l'architecture particulière du génome d'*A. vaga*.

Le principal objectif de ce mémoire était donc de mettre en évidence l'apparition potentielle de réarrangements chromosomiques chez *A. vaga* après induction de DSB. Afin de mettre en évidence des réarrangements massifs au sein du génome d'*A. vaga*, la méthode employée se base sur la digestion par enzyme de restriction du génome de bdelloïde et par la migration des fragments générés par PFGE. Afin de pouvoir correctement visualiser les bandes induites par la digestion enzymatique, il a été nécessaire d'optimiser les tests de restriction couplés aux gels PFGE.

### 5.1. Le stockage des échantillons n'induit pas de DSB

L'objectif de cette partie était de d'établir un protocole permettant de stocker des bdelloïdes hydratés. La mise au point de cette méthode a été réalisée pour contrecarrer des problèmes techniques. En effet, il est parfois difficile d'obtenir des populations denses et synchronisées. Le stockage avait donc pour but de mieux gérer le temps au laboratoire en fixant les échantillons tout en maintenant leur qualité.

Le premier a été réalisé afin de déterminer si la méthode de congélation induisait des DSB au sein de génome d'*A. vaga*. Deux méthodes ont été testées : les bdelloïdes hydratés ont été congelés à l'azote liquide puis placés à -80°C ou ; les bdelloïdes hydratés ont été directement placés à -80°C. L'intégrité du génome a ensuite été analysée par PFGE et un plug contenant des bdelloïdes irradiés (800 Gy de protons) a été ajouté pour visualiser des DSB. Les échantillons fixés ne présentent pas de cassures, au même titre que les bdelloïdes hydratés mais non congelés. Les méthodes de congélation n'induisent donc pas de cassures double brin de façon significative. Cependant, un très faible signal peut être détecté aux alentours de 2.200 kb chez les échantillons plongés dans l'azote liquide suggérant une induction très faible de DSB. Le deuxième test a eu pour but de déterminer le temps maximal de stockage permettant de maintenir une qualité suffisante des échantillons. Une durée de 18 jours a été choisie arbitrairement. Au bout de ce laps de temps, les bdelloïdes congelés à -80°C ne présentent pas de différence significative avec les bdelloïdes non congelés.

Sur base de ces deux expériences, il est possible d'affirmer que la congélation des bdelloïdes en les plaçant directement à -80°C n'induit pas de DSB. De plus, les échantillons peuvent être

gardés 18 jours sans présenter une augmentation significative de cassures double brin. Ces résultats suggèrent que la congélation est un moyen efficace de stocker des échantillons sans en diminuer leur qualité. Ainsi, ils peuvent être utilisés plusieurs jours après le stockage sans affecter le résultat de l'expérience.

## **5.2. Les rayons X diminuent la fertilité, induit des DSB mais ne diminue pas la survie**

Précédemment, l'impact d'irradiations aux protons et aux rayons  $\gamma$  a été testé sur *A. vaga* (Gladyshev & Meselson, 2008; Hespeels *et al.*, 2014). Il a été montré que ces radiations ionisantes pouvaient induire une baisse de fertilité ainsi qu'une fragmentation du génome sans affecter le taux de survie. Les effets des rayons X en revanche n'ont jamais été documentés chez *A. vaga*. Le but de cette partie du mémoire était donc d'étudier l'impact des rayons X sur la survie, la fertilité et l'intégrité du génome de bdelloïdes. De plus, les irradiations aux rayons X présentent plusieurs avantages techniques par rapport aux protons. Le changement et la standardisation des protocoles d'irradiations vers les rayons X sont discutés dans cette partie.

### **5.2.1. Survie et fertilité**

L'induction massive de cassures double brin se faisait préalablement par exposition à des protons via un accélérateur de particules (LARN, UNamur) (Hespeels *et al.*, 2014). Cependant, les irradiations aux protons posaient quelques problèmes. Tout d'abord, les bdelloïdes ne pouvaient être irradiés que sous forme desséchée, un seul échantillon à la fois, limitant l'étude des irradiations sur des individus hydratés. Deuxièmement, il est difficile de savoir si tous les bdelloïdes ont pu être irradiés à la même dose. En effet, les protons sont des particules chargées, leur dépôt d'énergie maximal se fait à une certaine profondeur au sein de la matière en fonction de leur énergie de départ (pic de Bragg, voir Figure 16). Il est donc possible que le patch (regroupement naturel de bdelloïdes desséchés) soit plus épais que la profondeur affectée par les protons. Les résultats des irradiations pourraient donc être biaisés par la présence de bdelloïdes peu ou pas irradiés. Finalement, les irradiations aux protons demandent l'intervention de l'accélérateur de particule au sein du LARN à l'Unamur. L'utilisation de cet accélérateur demande l'intervention de personnel qualifié ainsi que plusieurs heures de préparation. Les irradiations aux rayons X permettent en revanche d'éviter les problèmes cités ci-dessus. La machine utilisée (PXi X-RAD 225 XL) est utilisable par toute personne et peut être prête en 15 minutes. Par ailleurs, plus d'échantillons peuvent être irradiés en même temps, limitant alors le temps total d'exposition. Des échantillons hydratés peuvent également être irradiés, permettant une étude plus complète des effets des rayons X. Finalement, les échantillons irradiés reçoivent la même dose de radiations car, contrairement aux protons, les rayons X déposent leur énergie de manière (presque) linéaire (voir *Introduction – Radiations ionisantes*).

L'évaluation du nombre de bdelloïdes vivants hydratés ou desséchés après avoir été irradiés semble suggérer que les rayons X n'influencent pas le taux de survie aux doses étudiées (500 à 2.000 Gy) (Figure 32 A et B). Un taux proche de 100% a également été observé chez des bdelloïdes irradiés jusqu'à 800 Gy de protons (Hespeels *et al.*, 2014). Certains tests ont également pu montrer que des bdelloïdes pouvaient survivre jusqu'à 10.000 Gy de protons ou de particules  $\alpha$  (taux de survie aux alentours de 10 à 20 %, données non présentées). Il serait alors

intéressant de tester des doses d'irradiation de rayons X plus importantes comme cela a déjà été fait avec les tardigrades et *D. radiodurans* et les bdelloïdes exposés aux protons ou particules  $\alpha$  (Horikawa *et al.*, 2006; Repar *et al.*, 2010).

La survie permet de connaître les effets des radiations sur les cellules somatiques des bdelloïdes. Pour étudier ces effets sur les cellules germinales, il est indispensable de s'intéresser à la fertilité (ou capacité de reproduction). Si les cellules germinales sont peu touchées (protéines encore intactes) ou si elles réparent de façon très efficace leur génome après irradiation, la fertilité sera élevée. Au contraire, si ces cellules n'arrivent plus à réparer correctement le génome (mutations par exemple) ou si les dégâts sont trop importants, alors la capacité de reproduction sera faible. Dans le cadre de ce mémoire, la fertilité de bdelloïdes desséchés et irradiés a été évaluée. Les observations ont été comparées à celles de la fertilité chez des bdelloïdes hydratés et irradiés.

La fertilité des bdelloïdes desséchés est proche de 100 %, à la fois chez les individus non irradiés et les individus irradiés à 500 Gy (Figure 33 A). Cette dose n'apparaît donc pas comme étant limitante à la fertilité. La proportion de bdelloïdes fertiles diminue drastiquement à des doses supérieures à 500 Gy, et atteint 0% quand les rotifères reçoivent une dose de 2.000 Gy. Cette diminution peut être expliquée par l'augmentation du nombre de dégâts occasionnés à l'ADN et aux protéines. Bien que le génome puisse être réparé fidèlement par les mécanismes de réparation, ces derniers deviennent saturés quand un trop grand nombre de DSB est présent (Repar *et al.*, 2010). De plus, l'inactivation irréversible des protéines par carbonylation diminue la capacité de la cellule à réparer les DSB (Nyström, 2005; Azzam *et al.*, 2012). La saturation des protéines de réparation couplé à leur inactivation explique la diminution importante de la fertilité entre 500 et 1.000 Gy. De manière générale, la fertilité chez les bdelloïdes hydratés est légèrement plus faible, mais diminue également de façon importante au-delà de 500 Gy (Figure 33 B).

Ces observations suggèrent que les mécanismes permettant de maintenir une fertilité élevée sont inopérants après une irradiation de plus de 500 Gy. Il s'agit de la saturation des mécanismes de réparation ainsi que l'inactivation irréversible des protéines de la cellule (dont certaines impliquées dans la réparation). La faible réparation des lésions de l'ADN couplé à l'inactivation globale des protéines induit la production d'œufs stériles. De plus, la différence entre les individus desséchés et hydratés peut s'expliquer par l'induction de ROS lors des irradiations. Ces dernières génèrent plus de radicaux libres quand l'eau est plus abondante (Azzam *et al.*, 2012; Schipler & Iliakis, 2013). Les bdelloïdes hydratés seraient donc sujet à plus de cassures à cause de la plus grande abondance de ROS. À l'avenir il serait intéressant de mettre en évidence la contribution des lésions directes (radiations) et indirectes (ROS) sur l'intégrité de l'ADN en utilisant comme modèle les bdelloïdes, pouvant se trouver sous forme hydratée et desséchée.

### 5.2.2. Intégrité du génome

L'intégrité du génome d'*A. vaga* a été évaluée par PFGE à la fois chez des bdelloïdes desséchés et hydratés. Ces individus ont été exposés à des doses allant jusqu'à 1.500 Gy. Les bdelloïdes desséchés (Figure 35 A) et hydratés (Figure 35 B) présentent des DSB dès 100 Gy d'irradiation, et la quantité de fragments courts augmente en fonction de la dose. Comme pour les



protons (Hespeels *et al.*, 2014), les rayons induisent donc une fragmentation du génome, plus importante à des doses élevées.

En comparant les échantillons hydratés et desséchés plus attentivement, il est possible d'observer une différence au niveau des profils PFGE (Figure 35 A et B puits n°6) longs fragments à 1.000 Gy. Chez les bdelloïdes hydratés, aucun fragment de 2.200 kb n'est détecté, mais leur présence est toujours observable chez les individus desséchés. Ce résultat suggère que les dégâts induits chez les bdelloïdes hydratés sont plus importants que chez les desséchés. La plus grande abondance de fragments courts peut être expliquée par la production de radicaux libres (Favier, 2003; Schipler & Iliakis, 2013). Les radiations ionisantes induisent en effet des ROS par le phénomène de radiolyse de l'eau (Azzam *et al.*, 2012; Schipler & Iliakis, 2013). Ces radicaux pourraient alors affecter indirectement l'ADN en le fragmentant de façon plus importante, réduisant la présence de longs fragments dans le gel. Ces observations sur gel corroborent les résultats de la fertilité, qui indiquaient qu'une plus grande proportion de bdelloïdes hydratés et irradiés devenait stérile.

Sur base de la taille moyenne des fragments générés et de la dose reçue, il a été possible de calculer le nombre de DSB par Gray par Mb. Ce nombre a été évalué à 0,002 DSB.Gy<sup>-1</sup>.Mb<sup>-1</sup> pour les bdelloïdes desséchés, et à 0,003 DSB.Gy<sup>-1</sup>.Mb<sup>-1</sup> pour les bdelloïdes hydratés. Ces valeurs indiquent que le nombre de cassures est plus important chez les bdelloïdes hydratés pour les raisons expliquées au paragraphe précédent. Cependant, ces nombres s'écartent légèrement de ceux observés chez des bdelloïdes irradiés aux rayons  $\gamma$  ( $\approx 0,005$  DSB.Gy<sup>-1</sup>.Mb<sup>-1</sup>, (Gladyshev & Meselson, 2008)). Cette différence peut être expliquée par la méthode de mesure de la taille moyenne des fragments ainsi qu'à l'imprécision de la mesure. Par ailleurs, les valeurs évaluées pour cette expérience se rapprochent plus de la valeur calculée par Hespeels *et al.* en 2014 ( $\approx 0,004$  DSB.Gy<sup>-1</sup>.Mb<sup>-1</sup>).

Les rayons, tout comme les protons et les rayons  $\gamma$  induisent une diminution de la fertilité au-delà d'un certain seuil. Au-delà de cette dose, les mécanismes de réparation de l'ADN sont saturés, et une grande partie des protéines de la cellule sont inactivées. Certaines de ces protéines sont impliquées dans le métabolisme, et d'autres dans la réparation des DSB. De plus, les rayons X induisent des cassures double brin dans le génome, et ce nombre de DSB augmente avec la dose, comme observé avec les protons et les rayons  $\gamma$ . Enfin, de la même manière que les deux types de radiations cités, les rayons X n'induisent pas de diminution de la survie, même à forte doses (2.000 Gy dans cette expérience). En pratique, les rayons X se révèlent plus appropriés que les protons à une étude complète des effets des radiations sur les bdelloïdes. En effet, les irradiations aux rayons X présentent plusieurs avantages dont celui de pouvoir exposer des individus desséchés et hydratés. Cependant, il sera nécessaire de réaliser ultérieurement une comparaison directe des bdelloïdes desséchés et hydratés sur un même gel. En effet, la comparaison de plusieurs bandes de différents gels PFGE est impossible car la luminosité et le contraste de chaque gel a été modifié indépendamment. Le futur gel devra donc se focaliser sur la comparaison à certaines doses de bdelloïdes irradiés desséchés et hydratés, et cela, afin de déterminer avec certitude la taille des fragments en fonction de la condition. De nouvelles méthodes pourraient également être appliquées pour visualiser la cinétique de réparation du point de vue cellulaire, comme le *TUNEL assay*. Brièvement, cette technique consiste en l'incubation d'organismes avec l'enzyme *terminal deoxynucleotidyl Transferase*. Cette enzyme reconnaît les extrémités générées par des DSB ou SSB et y ajoute des dUTPs fluorescents. En présence de



DAPI (marquage de l'ADN), cette méthode permet de visualiser les processus de réparation au sein des différentes cellules du bdelloïde (Loo, 2011).

### **5.3. La cinétique de réparation n'est pas affectée par la microgravité**

La cinétique de réparation de bdelloïdes soumis à la dessiccation et à une irradiation aux protons a déjà été analysée par Hespeels *et al.* (2014). Dans le cadre de ce mémoire, la cinétique de réparation de bdelloïdes irradiés a d'abord été évaluée à 500 Gy de rayons X en 1g (gravité normale). Une deuxième expérience s'est focalisée sur la réparation de l'ADN en microgravité simulée. La dose a été fixée à 800 Gy et non à 500 Gy afin de mieux visualiser la cinétique de réparation. En effet, une irradiation à 500 Gy induit une fragmentation incomplète du génome, c'est-à-dire que des fragments >2.200 kb sont toujours observables (Figure 36). À 800 Gy, tout le génome est fractionné en fragments de <225 à ~1.125 kb. Par conséquent, la cinétique de réparation est plus visible car les gros fragments de >2.200 kb réapparaissent en fonction du temps.

Sous gravité normale et après une irradiation de 500 Gy, les bdelloïdes présentent un smear de fragments reflétant la fragmentation de leur génome. Deux heures après réhydratation, ce smear commence déjà à diminuer d'intensité, synonyme d'une réparation active des fragments d'ADN. Cette réparation semble être active jusqu'à 48 heures post réhydratation. Aux temps d'analyse ultérieurs (96 et 168 heures), les DSB sont toujours présents, bien qu'en moins grand nombre. La réparation des DSB semble ralentie voir arrêtée. Ces observations rejoignent celles de Hespeels *et al.* (2014), où la cinétique de réparation suit le même schéma après dessiccation ou irradiation aux protons.

Après 42 jours de réparation (tous les bdelloïdes irradiés sont morts, ne subsistent plus que leurs descendants), des cassures d'ADN sont toujours visibles. Cela signifierait que les générations suivantes de bdelloïdes ont acquis des fragments des bdelloïdes irradiés. Ce résultat ne correspond pas à la cinétique de réparation d'un autre bdelloïde (*Philodina roseola*) irradiés aux UV chez qui la réparation était quasi complète après 96h (Fischer *et al.*, 2013). Le signal observé après 42 jours peut être dû soit à la présence de fragments générés pendant la réparation, et dont les bdelloïdes ne se sont pas débarrassés, soit dû à la présence d'organisme étranger (contamination) dans les plugs. Cette expérience devra donc être refaite afin de déterminer si le signal observé est réellement dû à des fragments présents au sein des bdelloïdes.

La cinétique de réparation a ensuite été étudiée chez des individus irradiés à une dose de 800 Gy réhydratés en microgravité simulée en utilisant une 3D RPM (voir M&M) (Figure 39). Cette cinétique présente le même profil que celle d'individus réhydratés en gravité normale (Figure 36). La réparation des fragments semble commencer 2 heures après réhydratation et s'arrêter après 48 heures. Des fragments courts sont toujours visibles après 168 heures. Le profil de réparation est donc semblable à celui en gravité normale.

L'expérience a eu pour but de réellement comparer les cinétiques de réparation entre des échantillons réhydratés en microgravité ou gravité normale de 0 à 24 heures après réhydratation (Figure 40). Il est possible d'observer que la réparation débute 2 heures après réhydratation dans

les deux conditions. La taille moyenne des fragments d'ADN en condition de microgravité est supérieure qu'en condition 1g. Cette différence pourrait refléter un processus de réparation d'ADN plus rapide quand *A. vasa* est exposé à la microgravité. Ce second stress (le premier étant l'irradiation) pourrait augmenter la réparation de du génome. Cependant, il est important de noter qu'il semble y avoir un décalage de la migration de l'ADN pour la condition en microgravité 2 heures après réhydratation. Le signal à >2.200 kb à 2h en microgravité n'est pas observé dans les autres conditions, où ce signal se situe plutôt à 2.200 kb. Ces observations suggèrent que la différence observée entre les conditions 1g et microgravité pourrait être un artéfact. Aucune autre différence significative n'est observée pour les autres temps (6h et 24h). Cette expérience devra être réalisée à nouveau afin de confirmer ou infirmer les résultats et conclusions du présent gel.

Les expériences en microgravité simulée pourraient également être réalisées en 2D clinostat plutôt qu'en 3D RPM. La méthode en clinostat consiste à faire tourner sans cesse un tube contenant l'échantillon. La rotation rapide de celui-ci permet de maintenir la cellule ou l'organisme au milieu du tube et l'empêche de tomber au fond. Cette méthode a été proposée comme étant plus fiable par rapport à la 3D RPM car des doutes subsistent quant à sa fiabilité de la simulation de la microgravité (Herranz *et al.*, 2013; Brungs *et al.*, 2016; Hemmersbach *et al.*, 2017).

#### 5.4. Mise au point des profils de restriction enzymatique

L'objectif principal de ce mémoire est d'observer la présence ou l'absence de réarrangements chromosomiques après induction de DSB. Le développement d'une méthode efficace et reproductible de PFGE couplée à des profils de restriction était donc nécessaire afin d'étudier la dynamique des réarrangements chromosomiques chez *Adineta vasa*. De telles modifications génomiques jouent un rôle vital chez le champignon phytopathogène asexué *Verticillium dahliae* (De Jonge *et al.*, 2013). Cependant, certains organismes, comme *Deinococcus radiodurans*, possèdent une machinerie de réparation plus efficace permettant de limiter l'apparition de réarrangements après induction de DSB (Repar *et al.*, 2010). De futures expériences pourraient utiliser *A. vasa* comme modèle de la fidélité de la réparation chez les métazoaires.

L'étude de ces réarrangements a été réalisée à l'aide des profils de restriction couplés à une PFGE. Cette technique a déjà été utilisée chez d'autres organismes (Repar *et al.*, 2010). Une restriction correcte devrait répondre à deux critères. Tout d'abord, les bandes d'ADN devraient facilement être identifiables et distinguables du bruit de fond. Deuxièmement, il devrait y avoir assez de bandes d'ADN pour observer de potentiels réarrangements chromosomiques. Un trop grand nombre de bandes est à éviter afin de pouvoir discerner les bandes produites.

Précédemment, la restriction du génome d'*A. vasa* a déjà été réalisée par l'enzyme de restriction NotI (Dr. Boris Hespels, thèse de doctorat 2016). Dans le cadre de ce mémoire, l'optimisation des profils de restriction a été élargie à d'autres enzymes et à une combinaison de certaines enzymes (NotI, AsiSI, AscI, FseI, MseI, EcoRI, HinfI, SbfI, SgrAI, SexAI et PspXI, gels en Annexes II à X). Toutes ces enzymes (exceptées MseI, EcoRI et HinfI) possèdent un site de restriction de 7 à 8 nucléotides. Cette caractéristique a été déterminante dans le choix des enzymes à tester. En effet, plus le site de restriction est long, moins celui-ci sera présent dans le

génomique, générant ainsi des fragments de grandes tailles pouvant être analysés par PFGE. Plusieurs paramètres ont été testés empiriquement tels que le temps de digestion par l'enzyme ou les paramètres de la PFGE influençant la migration des fragments d'ADN.

Les tests d'optimisation (gels non présentés) ont permis de sélectionner 4 enzymes ou combinaison d'enzymes : NotI, AsiSi/NotI, SbfI et SgrAI (profils de restriction sur bdelloïdes hydratés repris à la Figure 41). Avec ces tests de restriction, il est donc possible d'analyser 4 régions différentes du génome d'*A. vago*, ce qui permet d'obtenir des résultats fiables quant à la présence ou l'absence de réarrangements. Le Tableau reprend les différents paramètres utilisés.

## **5.5. Pas de réarrangements chromosomiques après induction de DSB**

Afin de mettre en évidence de potentiels réarrangements chromosomiques, comme chez *Verticillium dahliae* (De Jonge *et al.*, 2013), des bdelloïdes ont d'abord été irradiés à 500 Gy de rayons. La cinétique de réparation a été évaluée par PFGE et digestion par NotI (Figure 38). Il apparaît que les bdelloïdes irradiés peuvent réparer de façon fidèle leur génome au cours du temps, probablement grâce à un mécanisme de réparation efficace. Cependant, cette expérience s'est focalisée sur une population entière comprenant des milliers d'individus. Par conséquent, il est impossible de déterminer si certains bdelloïdes ont subi un réarrangement chromosomique. C'est pourquoi l'intégrité génomique de 16 lignées clonales (donc descendants de 16 bdelloïdes irradiés) ont été analysées par profil de restriction couplé à une PFGE (NotI, AsiSi/NotI, SbfI et SgrAI). Chaque lignée provient d'un individu isolé ayant survécu à une irradiation de 500 Gy de rayons X, et est donc composée exclusivement de descendants. Les paramètres de digestion et de migration ont été optimisés et sont repris dans le Tableau 2. Tous les tests incluent également comme contrôle le profil de restriction des bdelloïdes du laboratoire, gardés constamment hydratés.

Les tests réalisés avec NotI et AsiSi/NotI n'ont pu être réalisés que sur 8 lignées clonales. Parmi celles-ci, un des échantillons avait été produit avec de l'agarose Invitrogen®, ce qui a pour conséquence que le profil de restriction est différent. Il est donc impossible d'inclure cet échantillon dans l'analyse des réarrangements chromosomiques. Il sera donc nécessaire de tester correctement cette lignée clonale afin de déterminer si les différences observées au niveau du profil de restriction sont dues au type d'agarose ou à des réarrangements.

L'analyse des profils de restriction produit une digestion par NotI révèle que les lignées clonales ont pu correctement réparer leur génome sans induire de réarrangements chromosomiques majeurs. Néanmoins, la population II B3 possède une bande en moins aux alentours de 1.050 kb. Avec ce seul gel, il est encore incertain si cette différence est due à une mauvaise résolution de l'échantillon, ou bien due à un véritable réarrangement (voir plus bas).

Le second test a été réalisé par digestion avec la combinaison d'enzymes AsiSi/NotI.

Dans ce gel, aucune bande n'est observable dans le puit n°6, probablement dû à un problème de digestion. La longueur des chromosomes encore intacts ne les permettait donc pas de migrer dans le gel. De plus, le plug V B3 présente un profil très peu contrasté, rendant impossible



l'analyse du profil de restriction. Toutes les autres lignées clonales présentent un profil de bandes similaire. Cela signifie, comme pour le premier test avec NotI, qu'aucun réarrangement chromosomique majeur ne s'est produit dans cette partie du génome analysée.

Quinze lignées clonales, dont 8 communes avec les deux tests précédents, ont ensuite été testées par SbfI (Figure 44 A puits n°2 à 10, Figure 44 B puits n°3 à 10). Les profils de restriction montrent un motif similaire. Les bandes observées se situent à la même position chez tous les échantillons. Comme pour les deux tests précédents, aucun réarrangement important n'est survenu lors de la réparation des DSB après 500 Gy de rayons X. La souche d'*Adineta editae* (N. Iakovenko, B. Hespels, communication personnelle) provenant de l'Antarctique présente quant à elle un profil de restriction différent (voir discussion plus bas dans le texte).

Enfin, l'analyse des profils de restriction par SgrA1 (Figure 52) est venue confirmer les résultats obtenus par les trois tests précédents. Tous les échantillons présentent le même profil, à l'exception des bdelloïdes de l'Antarctique (Figure 45 A puits n°2 à 10, Figure 45 B puits n°3 à 10).

La population II B3, possédant une bande en moins après digestion par NotI, présente un profil similaire aux autres lignées après digestion par les trois autres enzymes ou combinaisons d'enzymes. Ces observations suggèrent que la bande observée dans le premier test (NotI), serait dû à un manque de résolution et non à un réarrangement. En effet, un réarrangement provoqué dans une partie du génome peut affecter plusieurs profils de restriction, ce qui n'est pas observé dans ces résultats. Cette lignée clonale devra donc être testée à nouveau par NotI afin de déterminer la cause de cette différence.

Les résultats des tests de profils de restriction réalisés montrent que les rotifères peuvent réparer de façon efficace leur génome après une irradiation à 500 Gy de rayons X, au moins dans leurs cellules germinales. Cette hypothèse a également été avancée chez *Deinococcus radiodurans* car cette bactérie ne présente pas de réarrangements après une irradiation à 5.000 Gy de rayons  $\gamma$  (Repar *et al.*, 2010). La présence d'une réparation efficace pourrait avoir apparue pendant l'évolution comme mécanisme de résistance à la dessiccation. Des périodes de déshydratation induisent des cassures qui s'accumulent en fonction du temps passé en anhydrobiose (Hespels *et al.*, 2014). Une réparation peu efficace induirait des réarrangements massifs pouvant mener à une réduction du fitness de l'animal. Il serait donc plus intéressant de réparer identiquement le génome afin de garantir la survie de l'individu. Cependant, il est possible que chez une faible proportion des bdelloïdes, des réarrangements se produisent, modifiant l'architecture du génome et permettant peut-être l'émergence, rare, de bdelloïdes au fitness plus élevé. Les réarrangements chromosomiques se produisent principalement au niveau de régions répétées dans le génome tels que des transposons (Argueso *et al.*, 2008). Plusieurs études ont en effet déjà montré l'importance de ces régions dans l'instabilité génomique (Bzymek & Lovett, 2001; Hedges & Deininger, 2007; Aguilera & Gómez-González, 2008). L'absence de réarrangements chez *A. vaga*, ainsi que chez *D. radiodurans*, indique la présence d'un mécanisme permettant de contrôler les recombinaisons entre régions répétées (Repar *et al.*, 2010).

À côté du mécanisme de réparation efficace, la composition et l'architecture du génome pourrait, de façon passive, protéger les chromosomes des réarrangements. Tout d'abord, la présence de plusieurs copies d'un même gène peut limiter la létalité induit par la perte de certains gènes



essentiels. Chez *A. vaga*, la plupart des gènes se trouvent en 4 copies (structure tétraploïde dégénérée). Par conséquent, si l'une de ces copies est endommagée, le bdelloïde possède toujours des copies « de secours » afin de garantir la viabilité de l'organisme. Un plus grand nombre de copie est également synonyme de plus de séquences homologues pouvant être utilisées lors de la recombinaison homologue. La structure du génome peut aussi offrir une protection au génome. Il a été observé chez *D. radiodurans* que son chromosome a une forme d'anneau compacte (Levin-Zaidman *et al.*, 2003). De ce fait, si des cassures sont induites, les extrémités générées restent proches les unes des autres, permettant une réparation efficace sans provoquer de réarrangement (Blasius *et al.*, 2008). Chez les eucaryotes, ce rôle pourrait être joué par la présence des territoires chromosomiques. Chaque chromosome possède un territoire qui lui est propre (Cremer & Cremer, 2010). Par conséquent, des extrémités libres générées par des radiations ionisantes auraient plus de chance d'être réparées correctement (les bons brins ensemble).

Il est possible que les expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire n'aient pas pu mettre en évidence la présence de réarrangements chromosomiques parmi les 16 lignées testées. Le nombre de bdelloïdes irradiés peut atteindre approximativement 20.000 individus (données personnelles). De plus, le processus expérimental (d'isolation de bdelloïdes, création d'une nouvelle population, préparation des échantillons et PFGE) demande du temps et il est impossible d'analyser un grand nombre d'échantillon par gel PFGE simultanément. Cependant, il envisageable que parmi ces milliers de bdelloïdes, certains aient pu acquérir un réarrangement. Toutefois, il est possible d'affirmer que les réarrangements chromosomiques ne se produisent pas fréquemment au sein de la population survivante de bdelloïdes irradiés. Pour augmenter la probabilité d'observer un réarrangement, Repar *et al.* ont irradié *D. radiodurans* avec des doses de rayons  $\gamma$  plus importantes (25.000 Gy), et ont pu observer la formation de réarrangements dans certaines lignées clonales. Cet effet serait dû à la saturation du système antioxydant, menant alors à une dégradation des protéines de réparation, ainsi qu'à la surabondance des DSB induits (Repar *et al.*, 2010). Chez *A. vaga*, l'augmentation de la dose de radiation pourrait induire les mêmes effets, cependant, la baisse de fertilité rendrait leur observation difficile. En effet, à partir de 500 Gy de rayons X ou de protons (Dr. Boris Hespeels, thèse de doctorat 2016), la fertilité diminue drastiquement, à la fois chez les bdelloïdes hydratés comme desséchés. Il est alors difficile d'obtenir un bon nombre de lignées clonales se développant correctement et rapidement. Pour contrer cet effet, des bdelloïdes ont été irradiés à 100 Gy de rayons X tous les jours pendant 40 jours afin de réduire la dose reçue en une irradiation. Cependant, le taux de survie à la fin du traitement était faible et aucun bdelloïde isolé n'a pu redémarrer une nouvelle population (observation personnelle). Par conséquent, il serait nécessaire de réduire la dose reçue par jour ou d'espacer les irradiations. Cela permettrait aux bdelloïdes de réparer les DSB tout en induisant une dose globale plus élevée. Ensuite, le génome de nouvelles lignées clonales devrait être étudié par le même protocole que celui appliqué dans ce mémoire (restriction et PFGE).

Si les réarrangements se produisent rarement, il serait peut-être possible d'en observer chez des espèces proches comme l'espèce *Adineta editae* provenant de l'Antarctique. L'analyse comparative de leur profil de restriction révèle de nouvelles informations. Malgré l'apparente la proximité des deux souches, le profil varie et peut être expliqué de deux façons. Des mutations pourraient avoir modifié un site de restriction, ou bien auraient pu en créer un nouveau. Certains fragments générés par digestion auraient alors une taille différente, se traduisant par un profil de restriction différent. L'autre hypothèse est celle des réarrangements chromosomiques, modifiant

l'architecture du génome par conséquent le profil de restriction. À l'heure actuelle, il est impossible de déterminer lequel de ces deux phénomènes a eu lieu au cours de l'évolution. Le séquençage du génome d'*Adineta editae* pourrait permettre de répondre à la question. Cependant, l'assemblage de celui-ci demande beaucoup de temps et doit faire face à plusieurs difficultés importantes.

Selon les résultats obtenus sur les lignées clonales du laboratoire, les réarrangements chromosomiques pourraient ne pas un rôle majeur dans l'évolution des rotifères bdelloïdes. Cependant, des expériences supplémentaires sont nécessaire afin de confirmer ou informer cette hypothèse. Contrairement, à *V. dahliae* chez qui les réarrangements sont une force évolutive majeure (De Jonge *et al.*, 2013), les bdelloïdes pourraient évoluer grâce à d'autres mécanismes tels que les transferts horizontaux de gènes (Boschetti *et al.*, 2012; Flot *et al.*, 2013; Eyres *et al.*, 2015; Debortoli *et al.*, 2016). Cependant, il n'est pas exclu que des réarrangements se produisent rarement chez quelques individus. Cet événement pourrait être favorisé par l'induction de DSB causée par une période de dessiccation. L'architecture du génome serait alors modifiée et pourrait potentiellement augmenter le fitness de l'individu.

Afin de mieux comprendre le rôle des réarrangements dans l'évolution des bdelloïdes, il serait intéressant d'étudier le génome d'une espèce proche phylogénétiquement parlant. En effet, les réarrangements sont peu fréquents, voir rares, il serait donc doute difficile de les observer au laboratoire sur un nombre limité d'individus. Cependant, si les réarrangements jouent un véritable rôle évolutif, ils seraient peut-être détectables chez une autre espèce proche (appartenant au même genre par exemple) mais vivant dans un habitat différent (comme *Adenita vaga*). Dans ce cas, des réarrangements auraient pu survenir chez certains individus et les auraient permis de s'adapter à ce nouveau milieu. De futures analyses des génomes de bdelloïdes provenant de l'Antarctique pourraient être réalisées afin d'approfondir la connaissance des rôles des réarrangements chez les espèces asexuées.

## 6. Conclusions et perspectives

Les espèces asexuées ont longtemps été considérées comme des « cul-de-sacs » de l'évolution, et ce, pour deux principales raisons. Tout d'abord, les mutations (délétères ou non) s'accumuleraient au cours du temps (*Muller's ratchet*). Deuxièmement, en absence de méiose, la variabilité est plus faible, limitant les adaptations aux changements environnementaux. Toutefois, certaines espèces tels que les rotifères bdelloïdes et leur ancienne asexualité semblent défier les problèmes prédits par la théorie, leur valant le surnom de « scandales évolutifs » (Maynard Smith, 1986). De plus, le séquençage du bdelloïde *Adineta vaga* a également permis de mettre en évidence une architecture génomique particulière, incompatible avec tout processus méiotique classique (Flot *et al.*, 2013). Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer les forces évolutives en jeu chez les asexués.

La première d'entre elles est la conversion génique. Ce phénomène se produit lors de la réparation d'une cassure double brin. La lésion à l'ADN est réparée en utilisant comme modèle la séquence homologue, ce qui peut induire une réécriture de l'allèle touché. Par conséquent, la mutation présente à cet endroit est « effacée », limitant donc le *Muller's ratchet* (Marais, 2003; Flot *et al.*, 2013). A deuxième hypothèse est le transfert horizontal de gène permettant aux bdelloïdes d'augmenter leur fitness. Les HGT chez les procaryotes jouent un rôle évolutif important et il semblerait que ce rôle soit également présent chez certaines espèces eucaryotiques comme les bdelloïdes (Flot *et al.*, 2013; Debortoli *et al.*, 2016). La dernière hypothèse est celle des réarrangements chromosomiques pouvant apparaître à la suite de la réparation de DSB. De Jonge *et al.* en 2013 ont pu démontrer l'importance de ces réarrangements dans l'évolution de *Verticillium dahliae*, un champignon phytopathogène asexué.

L'observation des profils de restriction de 8 à 16 lignées clonales de bdelloïdes ayant survécu à une irradiation aux rayons X permet de démontrer que les réarrangements chromosomiques sont absents ou rares. Cette observation peut être expliquée par plusieurs hypothèses non exclusives. Premièrement par la présence d'un mécanisme de réparation efficace limitant les réarrangements entre régions répétées comme chez *D. radiodurans*. Deuxièmement par l'organisation du génome au sein du noyau permettant de garder des extrémités générées par un DSB proches l'une de l'autre. Troisièmement par la présence de plusieurs copies issues de l'évènement de duplication du génome. Ainsi, si une copie est endommagée, les autres sont toujours présentes pour assurer la fonction. Afin de pouvoir confirmer cette absence de réarrangements, de nouveaux tests de restriction devraient être réalisés sur un plus grand nombre de lignées clonales, car certains bdelloïdes irradiés pourraient tout de même avoir subi un réarrangement.

Le deuxième objectif de ce mémoire était de déterminer quels étaient les effets de la microgravité simulée sur la cinétique de réparation du génome chez *Adineta vaga* après irradiation. Les résultats de ce mémoire suggèrent que la microgravité n'influence pas la cinétique de réparation. Cependant, à cause d'une incertitude au niveau d'un gel, cette expérience devra être réalisée à nouveau afin de confirmer ou infirmer ces résultats. Des tests ultérieurs pourraient être menés en utilisant les méthodes de profil de restriction optimisés dans ce mémoire dans le but d'étudier l'efficacité de la réparation sous microgravité.



## 7. Références

- Aguilera, A. & Gómez-González, B. 2008. Genome instability: A mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 204–217.
- Alpert, P. 2005a. Sharing the Secrets of Life Without Water. *Integr. Comp. Biol.* **45**: 683–684.
- Alpert, P. 2005b. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr. Comp. Biol.* **45**: 685–695.
- Argueso, J.L., Westmoreland, J., Mieczkowski, P.A., Gawel, M., Petes, T.D. & Resnick, M.A. 2008. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. *PNAS* **105**: 11845–11850.
- Atallah, Z.K., Maruthachalam, K., Koike, S.T., Davis, R.M., Klosterman, S.J., Hayes, R.J., *et al.* 2010. Population analyses of the vascular plant pathogen *Verticillium dahliae* detect recombination and transcontinental gene flow. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 416–422. Elsevier Inc.
- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.P. & Pain, D. 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* **327**: 48–60. Elsevier Ireland Ltd.
- Baglioni, P., Sabbatini, M. & Horneck, G. 2007. *Complete Course in Astrobiology*.
- Basim, E. & Basim, H. 2001. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turkish J. Biol.* **25**: 405–418.
- Bentchikou, E., Servant, P., Coste, G. & Sommer, S. 2010. A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet.* **6**: 1–12.
- Billi, D. & Potts, M. 2002. Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.* **153**: 7–12.
- Blasius, M., Sommer, S. & Hübscher, U. 2008. *Deinococcus radiodurans*: What belongs to the survival kit? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**: 221–238.
- Boschetti, C., Carr, A., Crisp, A., Eyres, I., Wang-Koh, Y., Lubzens, E., *et al.* 2012. Biochemical Diversification through Foreign Gene Expression in *Bdelloid Rotifers*. *PLoS Genet.* **8**: 1–12.
- Boucher, Y., Douady, C.J., Papke, R.T., Walsh, D.A., Boudreau, M.E.R., Nesbø, C.L., *et al.* 2003. Lateral Gene Transfer and the Origins of Prokaryotic Groups. *Annu. Rev. Genet.* **37**: 283–328.
- Brunborg, G., Resnick, M.A. & Williamson, D.H. 1980. Cell-cycle-specific repair of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiat. Res.* **82**: 547–558.
- Brungs, S., Egli, M., Wuest, S.L., Christianen, P.C.M., van Loon, J.J.W.A., Ngo Anh, T.J., *et al.* 2016. Facilities for Simulation of Microgravity in the ESA Ground-Based Facility Programme. *Microgravity Sci. Technol.* 1–13. Microgravity Science and Technology.
- Bzymek, M. & Lovett, S.T. 2001. Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 8319–8325.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T. & Ravanat, J.-L. 1997. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. Vol. 131* 1–87.
- Caldecott, K.W. 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 619–631.
- Caprioli, M. & Ricci, C. 2001. Recipes for successful anhydrobiosis in bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* **446/447**: 13–17.



- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N. & Lieber, M.R. 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**: 495–506. Nature Publishing Group.
- Chuma, I., Isobe, C., Hotta, Y., Ibaragi, K., Futamata, N., Kusaba, M., *et al.* 2011. Multiple Translocation of the AVR-Pita Effector Gene among Chromosomes of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* and Related Species. *PLoS Pathog.* **7**: 1–20.
- Cleland, R.E. 1972. *Oenothera Cytogenetics and Evolution.*, Academic P. New-York.
- Cornish-Bowden, A. 1985. Nomenclature for incompletely bases in nucleic acid sequences : recommendations 1984. *Nucleic Acids Res.* **13**: 3021–3030.
- Cox, M.M., Keck, J.L. & Battista, J.R. 2010. Rising from the ashes: DNA repair in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet.* **6**: 1–2.
- Cremer, T. & Cremer, M. 2010. Chromosome Territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–23.
- Danchin, E.G.J. 2011. What Nematode genomes tell us about the importance of horizontal gene transfers in the evolutionary history of animals. *Mob. Genet. Elements* **1**: 269–273.
- Davies, J. & Davies, D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 417–433.
- De Jonge, R., Bolton, M.D., Kombrink, A., Van Den Berg, G.C.M., Yadeta, K.A. & Thomma, B.P.H.J. 2013. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Res.* **23**: 1271–1282.
- Debortoli, N., Li, X., Eyres, I., Fontaneto, D., Hespeels, B., Tang, C.Q., *et al.* 2016. Genetic exchange among bdelloid rotifers is more likely due to horizontal gene transfer than to meiotic sex. *Curr. Biol.* **26**: 723–732.
- Dunn, C.W., Giribet, G., Edgecombe, G.D. & Hejnol, A. 2014. Animal Phylogeny and Its Evolutionary Implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **45**: 371–395.
- Duret, L. & Galtier, N. 2009. Biased Gene Conversion and the Evolution of Mammalian Genomic Landscapes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1–27.
- Eccles, L.J., O'Neill, P. & Lomax, M.E. 2011. Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: Friend or foe? *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **711**: 134–141. Elsevier B.V.
- El Ghissassi, F., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Bouvard, V., *et al.* 2009. *A review of human carcinogens—Part D: radiation.*
- Eyres, I., Boschetti, C., Crisp, A., Smith, T.P., Fontaneto, D., Tunnacliffe, A., *et al.* 2015. Horizontal gene transfer in bdelloid rotifers is ancient, ongoing and more frequent in species from desiccating habitats. *BMC Biol.* **13**: 1–17. BMC Biology.
- Favier, A. 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual. Chim.* 108–115.
- Felsenstein, J. 1974. The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* **7**: 737–756.
- Ferrand, R. 2011. La protonthérapie : Technique de pointe à l ' interface entre la physique et la médecine. *Reflets la Phys.* **26**: 4–9.
- Fischer, C., Ahlrichs, W.H., Buma, A.G.J., van de Poll, W.H. & Bininda-Emonds, O.R.P. 2013. How does the “ancient” asexual *Philodina roseola* (Rotifera: Bdelloidea) handle potential UVB-induced mutations? *J. Exp. Biol.* **216**: 3090–3095.
- Flot, J., Hespeels, B., Li, X., Noel, B., Arkhipova, I., Danchin, E.G.J., *et al.* 2013. Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer *Adineta vaga*. *Nature* **0**: 1–5.
- Fontaneto, D. 2014. Molecular phylogenies as a tool to understand diversity in rotifers. *Int. Rev. Hydrobiol.* **99**: 178–187.

- Fontaneto, D. & Barraclough, T.G. 2015. Do Species Exist in Asexuals ? Theory and Evidence from Bdelloid Rotifers. *Integr. Comp. Biol.* 1–11.
- Fontaneto, D. & Jondelius, U. 2011. Broad taxonomic sampling of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I does not solve the relationships between Rotifera and Acanthocephala. *Zool. Anz.* **250**: 80–85.
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A.D., Berman, J. & Bennett, R.J. 2008. The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol.* **6**: 1084–1097.
- França, M.B., Panek, A.D. & Eleutherio, E.C.A. 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **146**: 621–631.
- Gaff, D.F. 1977. Desiccation tolerant vascular plants of southern Africa. *Oecologia* **31**: 95–109.
- Garey, J.R., Near, T.J., Nonnemacher, M.R. & Nadler, S.A. 1996. Molecular evidence for Acanthocephala as a subtaxon of Rotifera. *J. Mol. Evol.* **43**: 287–292.
- Garey, J.R., Schmidt-Rhaesa, A., Near, T.J. & Nadler, S. a. 1998. Review paper: The evolutionary relationships of rotifers and acanthocephalans. *Hydrobiologia* **387/388**: 83–91.
- Georgakilas, A.G., O'Neill, P. & Stewart, R.D. 2013. Induction and Repair of Clustered DNA Lesions: What Do We Know So Far? *Radiat. Res.* **180**: 100–109.
- Gilbert, J.J. 1974. Dormancy in rotifers. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **93**: 490–513.
- Gilbert, J.J. 2003. Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: Developmental and population biology. *Evol. Dev.* **5**: 19–24.
- Gladyshev, E.A. & Arkhipova, I.R. 2010. Genome Structure of Bdelloid Rotifers : Shaped by Asexuality or Desiccation ? *J. Hered.* **101**: 85–93.
- Gladyshev, E.A., Meselson, M. & Arkhipova, I.R. 2008. Massive Horizontal Gene Transfer in Bdelloid Rotifers. *Science (80-. )*. **320**: 1210–1213.
- Gladyshev, E. & Meselson, M. 2008. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 5139–5144.
- Golczyk, H. 2011. Cytogenetics of the permanent translocation heterozygote *rhoeo spathacea* var. *variegata*. Implications for complex chromosome rearrangements in *rhoeo*. *Caryologia* **64**: 325–334.
- Golczyk, H., Massouh, A. & Greiner, S. 2014. Translocations of Chromosome End-Segments and Facultative Heterochromatin Promote Meiotic Ring Formation in Evening Primroses. *Plant Cell* **26**: 1280–1293.
- Gresham, D., Desai, M.M., Tucker, C.M., Jenq, H.T., Pai, D.A., Ward, A., *et al.* 2008. The Repertoire and Dynamics of Evolutionary Adaptations to Controlled Nutrient-Limited Environments in Yeast. *PLoS Genet.* **4**: 1–19.
- Greubel, C., Ilicic, K., Rösch, T., Reindl, J., Siebenwirth, C., Moser, M., *et al.* 2017. Low LET proton microbeam to understand high-LET RBE by shaping spatial dose distribution. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res.* **404**: 155–161. Elsevier B.V.
- Gusev, O., Nakahara, Y., Vanyagina, V., Malutina, L., Cornette, R., Sakashita, T., *et al.* 2010. Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: Linkage with radioresistance. *PLoS One* **5**.
- Gyles, C. & Boerlin, P. 2014. Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. *Vet. Pathol.* **51**: 328–340.
- Hedges, D.J. & Deininger, P.L. 2007. Inviting instability: Transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **616**: 46–59.

- Hefferin, M.L. & Tomkinson, A.E. 2005. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*. **4**: 639–648.
- Hemmersbach, R., Hauslage, J., Waßer, K. & Brungs, S. 2017. Bioassays for Validation of Ground-Based Microgravity Simulators.
- Henner, W.D., Grunberg, S.M. & Haseltine, W. a. 1982. Sites and Structure of Gamma Radiation-induced DNA Strand Breaks. *J. Biol. Chem.* **257**: 11750–11754.
- Henner, W.D., Rodriguez, L.O., Hecht, S.M. & Haseltine, W.A. 1983. Gamma Ray Induced Deoxyribonucleic Acid Strand Breaks. *J. Biol. Chem.* **258**: 711–713.
- Herranz, R., Anken, R., Boonstra, J., Braun, M., Christianen, P.C.M., de Geest, M., *et al.* 2013. Ground-Based Facilities for Simulation of Microgravity : *Astrobiology* **13**: 1–17.
- Herschleb, J., Ananiev, G. & Schwartz, D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat. Protoc.* **2**: 677–684.
- Hespeels, B., Knapen, M., Hanot-Mambres, D., Heuskin, A.C., Pineux, F., Lucas, S., *et al.* 2014. Gateway to genetic exchange? DNA double-strand breaks in the bdelloid rotifer *Adineta vaga* submitted to desiccation. *J. Evol. Biol.* **27**: 1334–1345.
- Hoeijmakers, J.H.J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366–374.
- Holsinger, K.E., Ellstrand, N.C. & Kent Holsinger, H.E. 1984. The Evolution and Ecology of Permanent Translocation Heterozygotes. *Source Am. Nat. Am. Nat.* **124**: 48–71.
- Horikawa, D.D., Sakashita, T., Katagiri, C., Watanabe, M., Kikawada, T., Nakahara, Y., *et al.* 2006. Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**: 843–848.
- Horneck, G., Moeller, R., Cadet, J., Douki, T., Mancinelli, R.L., Nicholson, W.L., *et al.* 2012. Resistance of bacterial endospores to outer space for planetary protection purposes--experiment PROTECT of the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* **12**: 445–456.
- Hudson, C.T. & Gosse, P.H. 1886. *The Rotifera or wheel-animalcules (Vol I)*, Longmans, London.
- Hur, J.H., Van Doninck, K., Mandigo, M.L. & Meselson, M. 2009. Degenerate tetraploidy was established before bdelloid rotifer families diverged. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 375–383.
- IADC. 2007. *IADC Space Debris Mitigation Guidelines*.
- Johnston, P.J., MacPhail, S.H., Banáth, J.P. & Olive, P.L. 1998. Higher-Order Chromatin Structure-Dependent Repair of DNA Double-Strand Breaks: Factors Affecting Elution of DNA from Nucleoids. *Radiat. Res.* **149**: 533–542.
- Klosterman, S.J., Atallah, Z.K., Vallad, G.E. & Subbarao, K. V. 2009. Diversity , Pathogenicity , and Management of *Verticillium* Species. *Annu. Rev. Phytopathology* **47**: 39–62.
- Kobayashi, Y., Narumi, I., Satoh, K., Funayama, T., Kikuchi, M., Kitayama, S., *et al.* 2004. Radiation response mechanisms of the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biol. Sci. Space.* **18**: 134–135.
- Koonin, E. V, Makarova, K.S. & Aravind, L. 2001. Horizontal Gen Transfer in Prokaryotes : Quantification and Classification. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 709–742.
- Kranner, I. & Birtic, S. 2005. A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance. *Integr. Comp. Biol.* **45**: 734–740.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. & Zhao, X. 2012. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* **40**: 5795–5818.
- Krisko, A., Leroy, M., Radman, M. & Meselson, M. 2012. Extreme anti-oxidant protection against ionizing radiation in bdelloid rotifers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 2354–2357.



- Kumari, R., Singh, K.P. & DuMond, J.W. 2009. Simulated microgravity decreases DNA repair capacity and induces DNA damage in human lymphocytes. *J. Cell. Biochem.* **107**: 723–731.
- Lemoine, F.J., Degtyareva, N.P., Lobachev, K. & Petes, T.D. 2005. Chromosomal Translocations in Yeast Induced by Low Levels of DNA Polymerase: A Model for Chromosome Fragile Sites U. *Cell* **120**: 587–598.
- Levin-Zaidman, S., Englander, J., Shimoni, E., Sharma, A.K., Minton, K.W. & Minsky, A. 2003. Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance?. *Science* (80-. ). **299**: 254–256.
- Lieber, M.R. 2010. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**: 181–211.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 712–720.
- Lieber, M.R. & Wilson, T.E. 2010. SnapShot: Nonhomologous DNA end joining (NHEJ). *Cell* **142**: 6–7.
- Loo, D.T. 2011. In Situ Detection of Apoptosis by the TUNEL Assay: An Overview of Techniques. In: *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo* (Humana Press, ed), pp. 3–13. Hatfield.
- Marais, G. 2003. Biased gene conversion: implications for genome and sex evolution. *Trends Genet.* **19**: 330–338.
- Mark Welch, D.B., Mark Welch, J.L. & Meselson, M. 2008. Evidence for degenerate tetraploidy in bdelloid rotifers. *PNAS* **105**: 5145–5149.
- Marotta, R., Leasi, F., Uggetti, A., Ricci, C. & Melone, G. 2010. Dry and survive: Morphological changes during anhydrobiosis in a bdelloid rotifer. *J. Struct. Biol.* **171**: 11–17.
- Marotta, R., Uggetti, A., Ricci, C., Leasi, F. & Melone, G. 2012. Surviving Starvation: Changes Accompanying Starvation Tolerance in a Bdelloid Rotifer. *J. Morphol.* **273**: 1–7.
- Mattimore, V. & Battista, J.R. 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* **178**: 633–637.
- Maxwell, P.H., Burhans, W.C. & Curcio, M.J. 2011. Retrotransposition is associated with genome instability during chronological aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 20376–20381.
- Maynard Smith, J. 1986. Evolution: contemplating life without sex. *Nature* **324**: 300–301.
- Mazón, G., Mimitou, E.P. & Symington, L.S. 2010. SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell* **142**: 10–11.
- McVey, M., Khodaverdian, V.Y., Meyer, D., Cerqueira, P.G. & Heyer, W.-D. 2016. Eukaryotic DNA Polymerases in Homologous Recombination. *Annu. Rev. Genet.* **50**: 393–421.
- Michaels, M.L., Cruz, C., Grollman, A.P. & Miller, J.H. 1992. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 7022–7025.
- Mieczkowski, P.A., Lemoine, F.J. & Petes, T.D. 2006. Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. **5**: 1010–1020.
- Mognato, M. & Celotti, L. 2005. Modeled microgravity affects cell survival and HPRT mutant frequency, but not the expression of DNA repair genes in human lymphocytes irradiated with ionising radiation. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **578**: 417–429.
- Muller, H.J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **1**: 2–9.



- National Research Council. 2000. Scoping the Problem : Radiation in Space. In: *Radiation and the International Space Station : Recommendations to Reduce Risks*, pp. 7–23. Washington DC.
- Neumann, S., Reuner, A., Brümmer, F. & Schill, R.O. 2009. DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **153**: 425–429. Elsevier Inc.
- Nyström, T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *Eur. Mol. Biol. Organ.* **24**: 1311–1317.
- Ochman, H., Lawrence, J.G. & Groisman, E.A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299–304.
- Orbach, M.J., Farrall, L., Sweigard, J.A., Chumley, F.G. & Valent, B. 2000. A Telomeric Avirulence Gene Determines Efficacy for the Rice Blast Resistance Gene Pi-ta. *Plant Cell* **12**: 2019–2032.
- Page, S.L. & Hawley, R.S. 2003. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* (80-. ). **301**: 785–789.
- Paps, J., Baguna, J. & Riutort, M. 2009. Lophotrochozoa internal phylogeny: new insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **276**: 1245–1254.
- Persson, D., Halberg, K.A., Jørgensen, A., Ricci, C., Møbjerg, N. & Kristensen, R.M. 2011. Extreme stress tolerance in tardigrades: Surviving space conditions in low earth orbit. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **49**: 90–97.
- Pierce, A.J., Stark, J.M., Araujo, F.D., Moynahan, M.E., Berwick, M. & Jasin, M. 2001. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* **11**: 52–59.
- Poinar, G.O. & Ricci, C. 1992. Bdelloid rotifers in Dominican amber: Evidence for parthenogenetic continuity. *Experientia* **48**: 408–410.
- Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**: 755–805.
- Pouget, J.-P. & Mather, S.J. 2001. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur. J. Nucl. Med.* **28**: 541–561.
- Presgraves, D.C. 2005. Evolutionary Genomics : New Genes for New Jobs Whole genome sequence analyses have confirmed that gene. *Curr. Biol.* **15**: 52–53.
- Rabbow, E., Rettberg, P., Barczyk, S., Bohmeier, M., Parpart, A., Panitz, C., *et al.* 2012. EXPOSE-E: An ESA Astrobiology Mission 1.5 Years in Space. *Astrobiology* **12**: 374–386.
- Rauwolf, U., Greiner, S., Mráček, J., Rauwolf, M., Golczyk, H., Mohler, V., *et al.* 2011. Uncoupling of sexual reproduction from homologous recombination in homozygous *Oenothera* species. *Heredity (Edinb)*. **107**: 87–94.
- Repar, J., Cvjetan, S., Slade, D., Radman, M., Zahradka, D. & Zahradka, K. 2010. RecA protein assures fidelity of DNA repair and genome stability in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)*. **9**: 1151–1161. Elsevier B.V.
- Ricci, C. 2001. Dormancy patterns in rotifers. *Hydrobiologia* **446–447**: 1–11.
- Ricci, C. & Caprioli, M. 2005. Anhydrobiosis in Bdelloid Species, Populations and Individuals. *Integr. Comp. Biol.* **45**: 759–763.
- Ricci, C., Caprioli, M. & Fontaneto, D. 2007. Stress and fitness in parthenogens: is dormancy a key feature for bdelloid rotifers? *BMC Evol. Biol.* **7**: 1–7.
- Ricci, C., Caprioli, M., Fontaneto, D. & Melone, G. 2008. Volume and Morphology Changes of a Bdelloid Rotifer Species (*Macrotrachela quadricornifera*) During Anhydrobiosis. *J. Morphol.* **269**: 233–239.
- Ricci, C. & Melone, G. 2000. Key to the identification of the genera of bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* **418**: 73–80.

- Ricci, C., Melone, G., Santo, N. & Caprioli, M. 2003. Morphological response of a bdelloid rotifer to desiccation. *J. Morphol.* **257**: 246–253.
- Ricci, C. & Perletti, F. 2006. Starve and survive: stress tolerance and life-history traits of a bdelloid rotifer. *Funct. Ecol.* **20**: 340–346.
- Ricci, C.N. 1987. Ecology of bdelloids: how to be successful. *Hydrobiologia* **147**: 117–127.
- Richardson, A.O. & Palmer, J.D. 2007. Horizontal gene transfer in plants. *J. Exp. Bot.* **58**: 1–9.
- San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. 2008. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 229–257.
- Schipler, A. & Iliakis, G. 2013. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res.* **41**: 7589–7605.
- Schubert, I. 2007. Chromosome evolution. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 109–115.
- Schubert, I. & Lysak, M.A. 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in* **27**: 207–216.
- Segers, H. 2007. *Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution.*
- Segers, H. 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater.
- Seidl, M.F. & Thomma, B.P.H.J. 2014. Sex or no sex: Evolutionary adaptation occurs regardless. *BioEssays* **36**: 335–345.
- Seltzer, S.M., Bartlett, D.T., Burns, D.T., Dietze, G., Menzel, H.-G., Paretzke, H.G., *et al.* 2011. Report 85: Fundamental Quantities And Units For Ionizing Radiation (Revised). *J. ICRU* **11**: 1–35.
- Shiel, R.J. 1995. *A guide to identification of rotifers, cladocerans and copepods from australian inland waters.* Albury.
- Signorovitch, A., Hur, J., Gladyshev, E. & Meselson, M. 2015. Allele sharing and evidence for sexuality in a mitochondrial clade of bdelloid rotifers. *Genetics* **200**: 581–590.
- Simon, J.C., Delmotte, F., Rispe, C. & Crease, T. 2003. Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: The possible routes to parthenogenesis in animals. In: *Biological Journal of the Linnean Society*, pp. 151–163.
- Singh, S.K., Bencsik-Theilen, A., Mladenov, E., Jakob, B., Taucher-Scholz, G. & Iliakis, G. 2013. Reduced contribution of thermally labile sugar lesions to DNA double strand break formation after exposure to heavy ions. *Radiat. Oncol.* **8**: 1–10.
- Singh, S.K., Wang, M., Staudt, C. & Iliakis, G. 2011. Post-irradiation chemical processing of DNA damage generates double-strand breaks in cells already engaged in repair. *Nucleic Acids Res.* **39**: 8416–8429.
- Terzoudi, G.I., Hatz, V.I., Donta-Bakoyianni, C. & Pantelias, G.E. 2011. Chromatin dynamics during cell cycle mediate conversion of DNA damage into chromatid breaks and affect formation of chromosomal aberrations: Biological and clinical significance. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **711**: 174–186. Elsevier B.V.
- Usami, T., Itoh, A.M. & Amemiya, A.Y. 2009a. Asexual fungus *Verticillium dahliae* is potentially heterothallic. *J. Gen. Plant Pathol.* **75**: 422–427.
- Usami, T., Itoh, M. & Amemiya, Y. 2009b. Mating type gene MAT1-2-1 is common among Japanese isolates of *Verticillium dahliae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **73**: 133–137. Elsevier Ltd.
- van Leeuwenhoek, A. 1702. Part of a Letter from Mr Antony van Leeuwenhoek, F. R. S. concerning Green Weeds Growing in Water, and Some Animalcula Found about Them. *Philos. Trans. R. Soc. London* **23**: 1304–1311.

- Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F. & Okuda, T. 2002. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *J. Exp. Biol.* **205**: 2799–2802.
- Weinfeld, M., Mani, R.S., Abdou, I., Aceytuno, R.D. & Glover, J.N.M. 2011. Tidying up loose ends: The role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair. *Trends Biochem. Sci.* **36**: 262–271. Elsevier Ltd.
- Welch, D.M. & Meselson, M. 2000. Evidence for the Evolution of Bdelloid Rotifers Without Sexual Reproduction or Genetic Exchange. *Science (80-. )*. **288**: 1211–1215.
- Welch, J.L.M. & Meselson, M. 1998. Karyotypes of bdelloid rotifers from three families. *Hydrobiologia* **387/388**: 403–407.
- Welch, J.L.M., Welch, D.B.M. & Meselson, M. 2004. Cytogenetic evidence for asexual evolution of bdelloid rotifers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 1618–1621.
- Wisenbaugh, E.S., Andrews, P.E., Ferrigni, R.G., Schild, S.E., Keole, S.R., Wong, W.W., *et al.* 2014. Proton beam therapy for localized prostate cancer 101: basics, controversies, and facts. *Rev. Urol.* **16**: 67–75.
- Womersley, Ch. & Ching, C. 1989. Natural dehydration regimes as a prerequisite for the successful induction of anhydrobiosis in the nematode *Rotylenchulus reniformis*. *J. Exp. Biol.* **143**: 359–372.
- Wright, J.C. 1989. Desiccation Tolerance and Water-Retentive Mechanisms in Tardigrades. *J. Exp. Biol.* **142**: 267–292.
- Yatagai, F., Honma, M., Takahashi, A., Omori, K., Suzuki, H., Shimazu, T., *et al.* 2011. Frozen human cells can record radiation damage accumulated during space flight: Mutation induction and radioadaptation. *Radiat. Environ. Biophys.* **50**: 125–134.
- Yatagai, F. & Ishioka, N. 2014. Are biological effects of space radiation really altered under the microgravity environment? *Life Sci. Sp. Res.* **3**: 76–89. Elsevier Ltd.

## **8. Annexes**

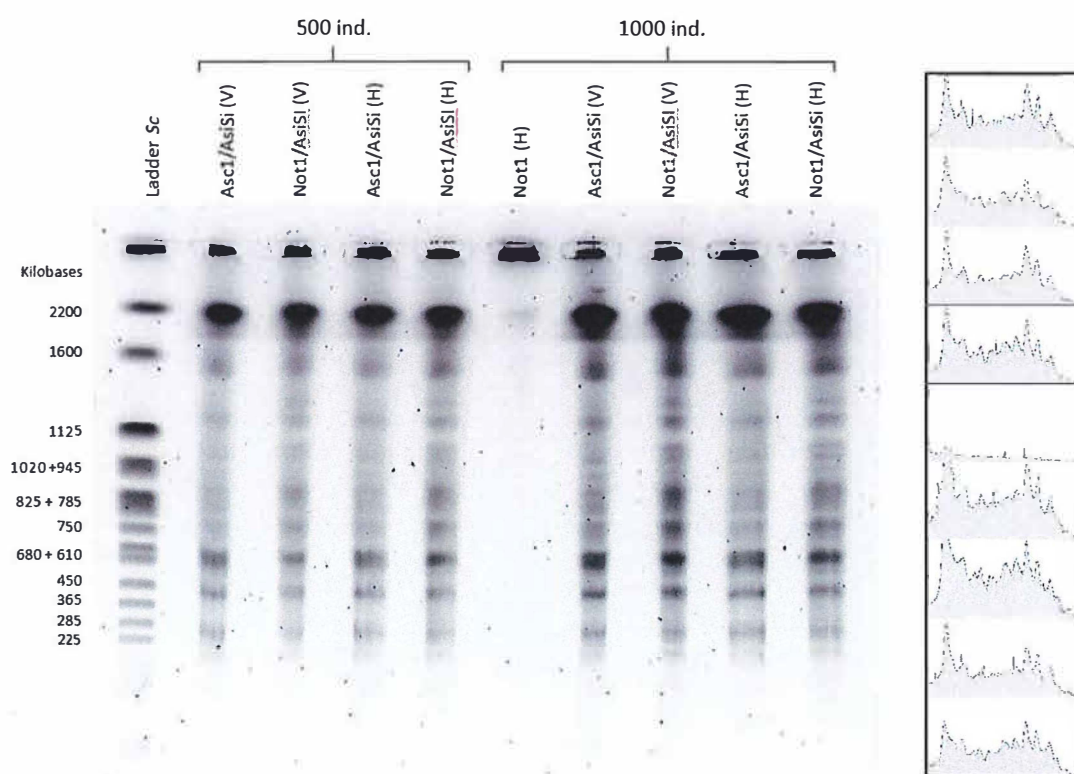


## Annexes I : Analyses statistiques taille des populations

<i>45 <math>\mu</math>l</i>			<i>10 <math>\mu</math>l</i>		
Comparaison	p-valeur		Comparaison	p-valeur	
Ctl vs. 500	2,82E-13	***	Ctl vs. 500	1,07E-12	***
Ctl vs. 1000	< 2,20E-16	***	Ctl vs. 1000	< 2,20E-16	***
Ctl vs. 1500	< 2,20E-16	***	Ctl vs. 1500	< 2,20E-16	***
Ctl vs. 2000	< 2,20E-16	***	Ctl vs. 2000	< 2,20E-16	***
500 vs. 1000	< 2,20E-16	***	500 vs. 1000	3,41E-05	***
500 vs. 1500	< 2,20E-16	***	500 vs. 1500	1,34E-05	***
500 vs. 2000	< 2,20E-16	***	500 vs. 2000	5,78E-07	***
1000 vs. 1500	0,0495	*	1000 vs. 1500	0,6712	n.s.
1000 vs. 2000	0,0126	*	1000 vs. 2000	0,0824	*
1500 vs. 2000	0,3254	n.s.	1500 vs. 2000	0,1590	n.s.

Figure Annexe I : Tests statistiques réalisés sur les tailles moyennes des populations redémarrées à partir de bdelloïdes irradiés à 500 Gy et nourris avec soit 45 ou 10  $\mu$ l. Pour chaque comparaison, un test de Shapiro-Wilk a été réalisé afin de tester la normalité (données non normales). Ensuite un test de Wilcoxon a été réalisé sur chaque comparaison. \*\*\* : très hautement significatif ; \* : significatif ; n.s. : non significatif.

## Annexes II : Restriction par Asc1/AsiSi, Not1/AsiSi avec 500 ou 1.000 individus

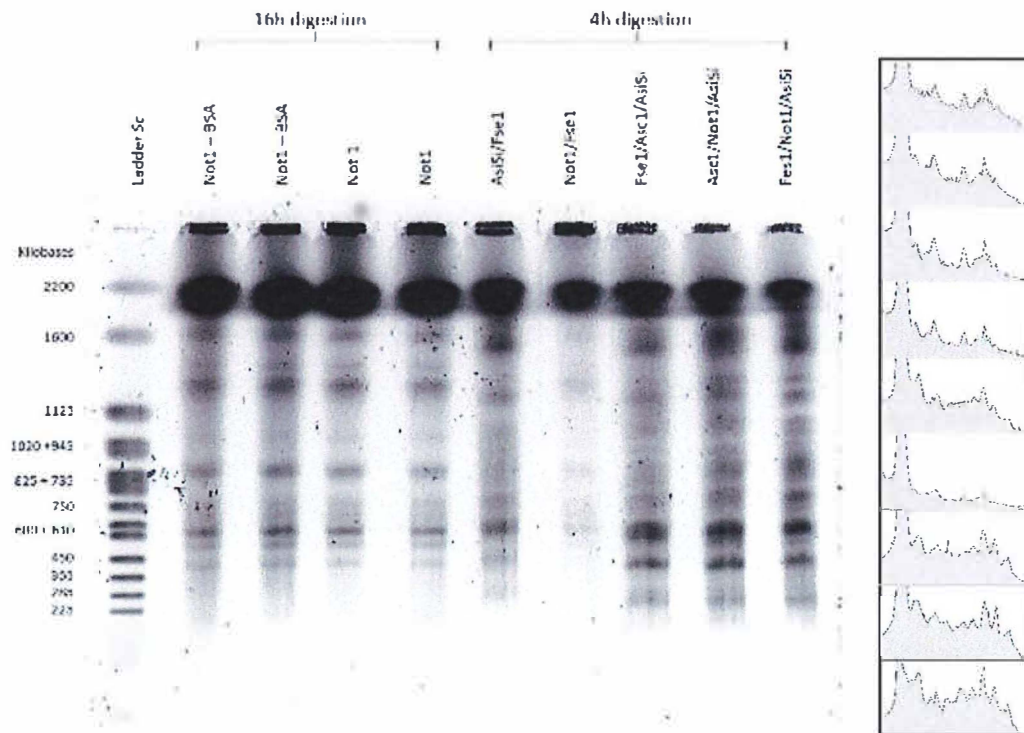


### Paramètres utilisés :

- CHEF DRII
- Agarose : 0,8%
- Voltage : 190V
- Switch time : 60-185s
- Temps de migration : 22h
- Température : ~3°C

Figure 40 : Profils restriction d'individus *A. vago* hydratés. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 500 ou 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 190 V avec un temps d'impulsion variant de 60 à 185s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 0,8%. Les échantillons ont été digérés 4h. Les plugs ont été positionnés soit verticalement (V) ou horizontalement (H). Les puits correspondent au profil de restriction de Not1, de Asc1/Not1 ou de Not1/AsiSi.

### Annexes III : Restriction par Not1-BSA, Not1, AsiSi/Fse1, Fse1/Asc1/AsiSi, Asc1/Not1/AsiSi, Fse1/Not1/AsiSi.

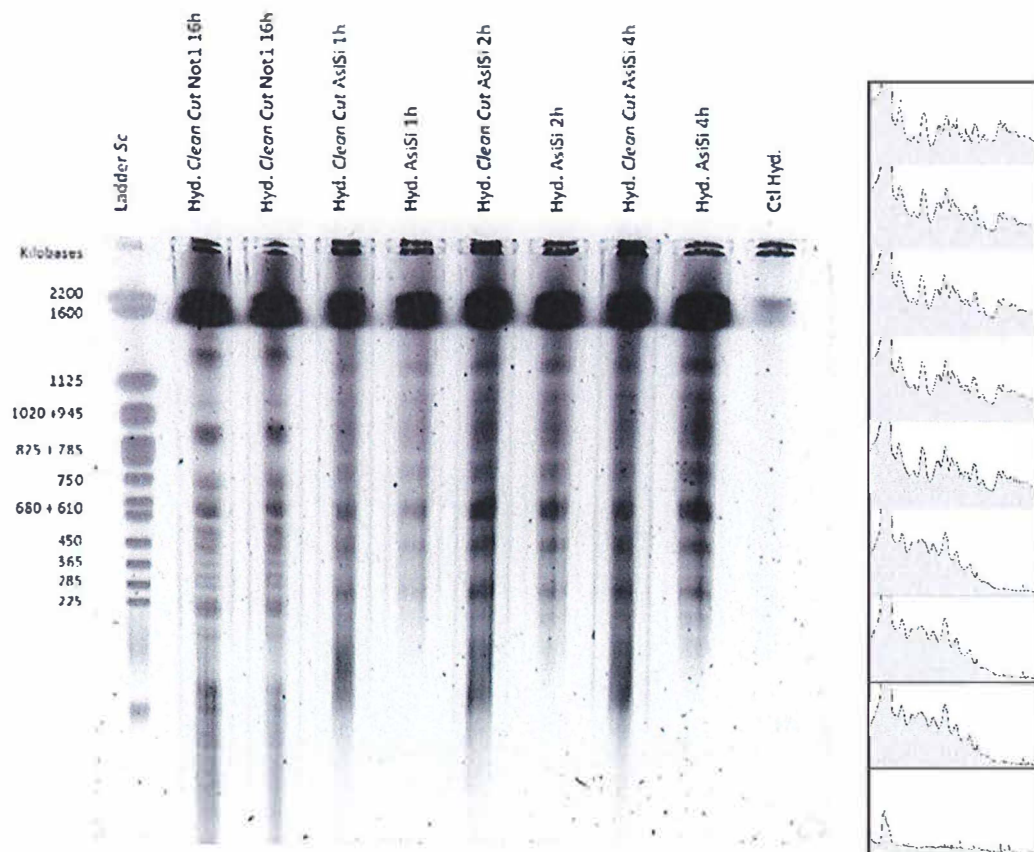


#### Paramètres utilisés :

- CHEF DRII
- Agarose : 0,8%
- Voltage : 190V
- Switch time : 60-185s
- Temps de migration : 22h
- Température : ~3°C

Figure 41 : Profils restriction d'individus *A. vaga* hydratés. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 190 V avec un temps d'impulsion variant de 60 à 185s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 0,8%. Les puits correspondent respectivement au profil de restriction de Not1 avec ajout de BSA (pendant la digestion), Not1, AsiSi/Fse1, Not1/Fse1, Fse1/Asc1/AsiSi, Asc1/Not1/AsiSi et Fse1/Not1/AsiSi. Le rôle hypothétique de la BSA (*Bovine Serum albumine*) était d'améliorer la résolution des bandes d'ADN. Cependant, un bruit de fond plus important est observable pour les échantillons avec de la BSA. Le temps de digestion était de 4h pour les échantillons digérés uniquement par Not1, et de 16h pour les autres.

## Annexes IV : Restriction par Not1 *Clean Cut*, AsiSi 1, 2 ou 4h



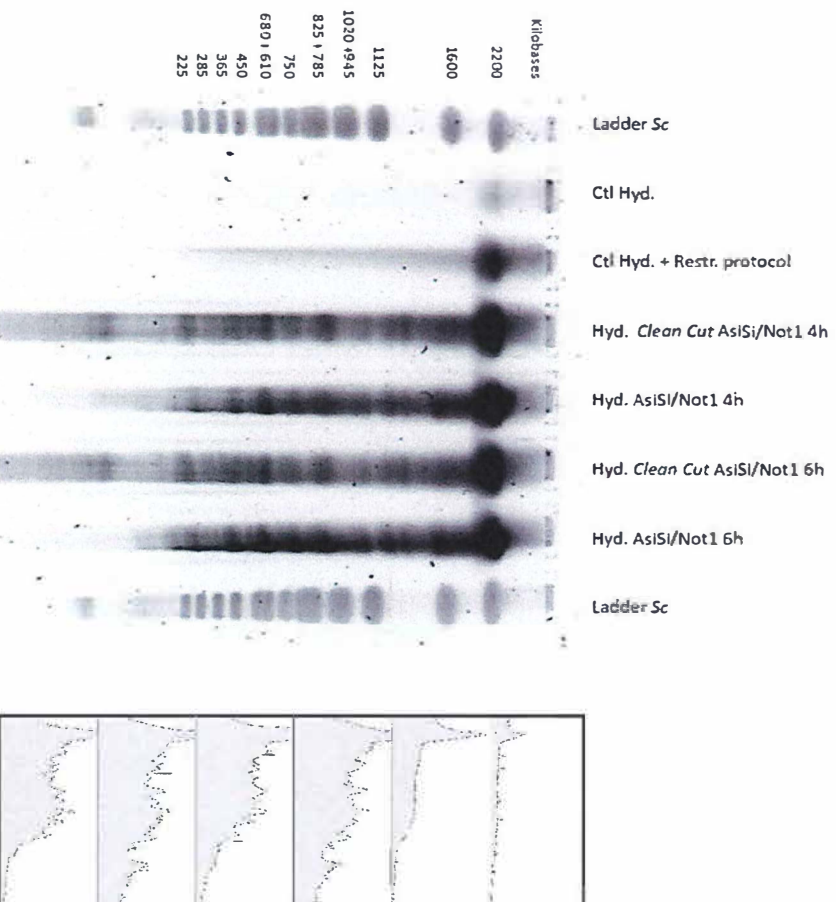
### Paramètres utilisés :

- CHEF MAPPER
- Agarose : 1%
- Voltage : 5,5V/cm
- Switch time : 50-150s
- Temps de migration : 22h
- Température : 14°C

Figure 42 : Profils restriction d'individus *A. vaga* hydratés. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 5,5V/cm avec un temps d'impulsion variant de 50 à 150s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 1%. Les puits correspondent au profil de restriction de Not1 ou AsiSi. Le temps de digestion était de 16h pour Not1 et 1, 2 ou 4h pour AsiSi. Une partie des échantillons ont été produit avec de l'agarose *Clean Cut*.



## Annexes V : Restriction par AsiSi/NotI 4 ou 6h – CHEF DRII

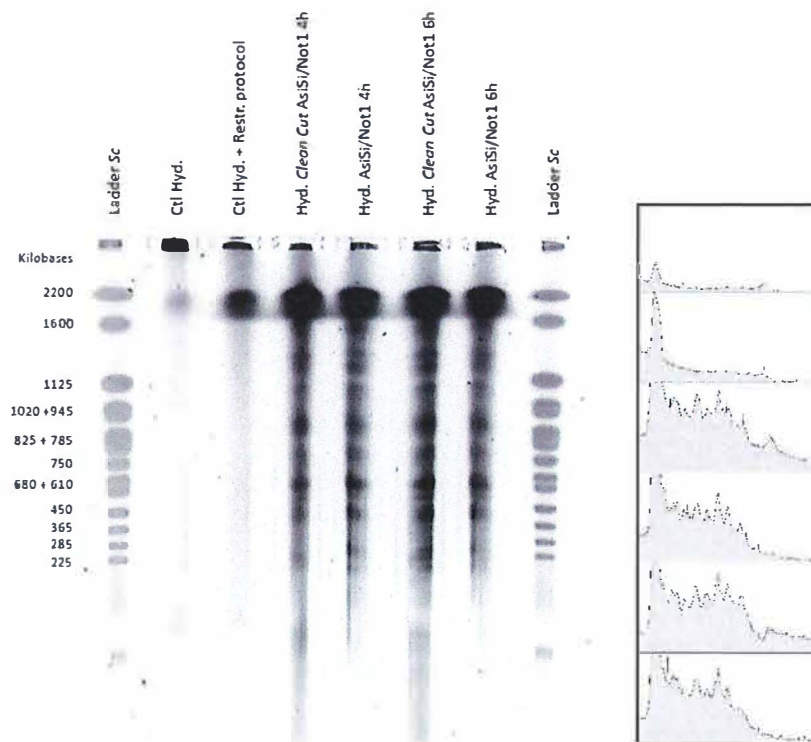


### Paramètres utilisés :

- CHEF DRII
- Agarose : 0,8%
- Voltage : 190V
- Switch time : 60-185s
- Temps de migration : 22h
- Température : ~3°C

Figure 43 : Profils restriction d'individus *A. vega* hydratés. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 190V avec un temps d'impulsion variant de 60 à 185s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 0,8%. Le puit n°2 contient un échantillon ayant subi le protocole de digestion mais sans enzyme. Les autres échantillons ont été digérés par AsiSi/NotI pendant 4 ou 6h. La migration a été effectuée par la CHEF DRII.

## Annexes VI : Restriction par AsiSi/Not1 4 ou 6h – CHEF MAPPER

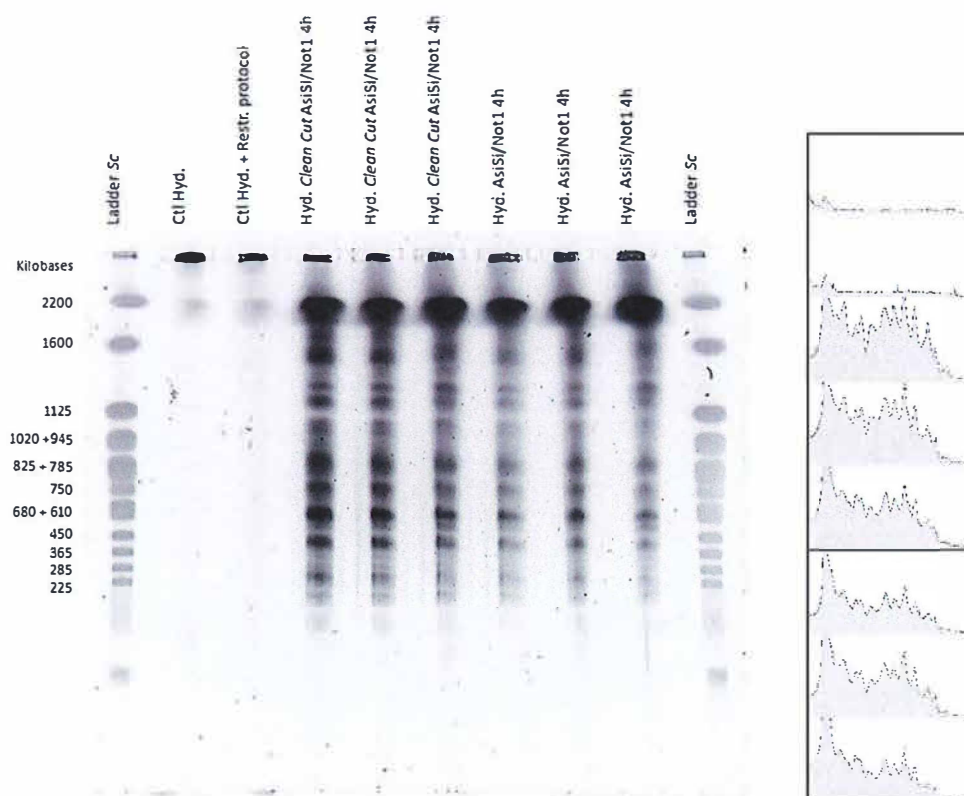


### Paramètres utilisés :

- CHEF MAPPER
- Agarose : 0,8%
- Voltage : 5,5V/cm
- Switch time : 60-185s
- Temps de migration : 22h
- Température : 8°C

Figure 44 : Profils restriction d'individus *A. vaga* hydratés. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 190V avec un temps d'impulsion variant de 60 à 185s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 0,8%. Le puit n°2 contient un échantillon ayant subi le protocole de digestion mais sans enzyme. Les autres échantillons ont été digérés par AsiSi/Not1 pendant 4 ou 6h. La migration a été effectuée par la CHEF MAPPER.

## Annexes VII : Restriction par AsiSi/Not1 4h *Clean Cut* ou Invitrogen®

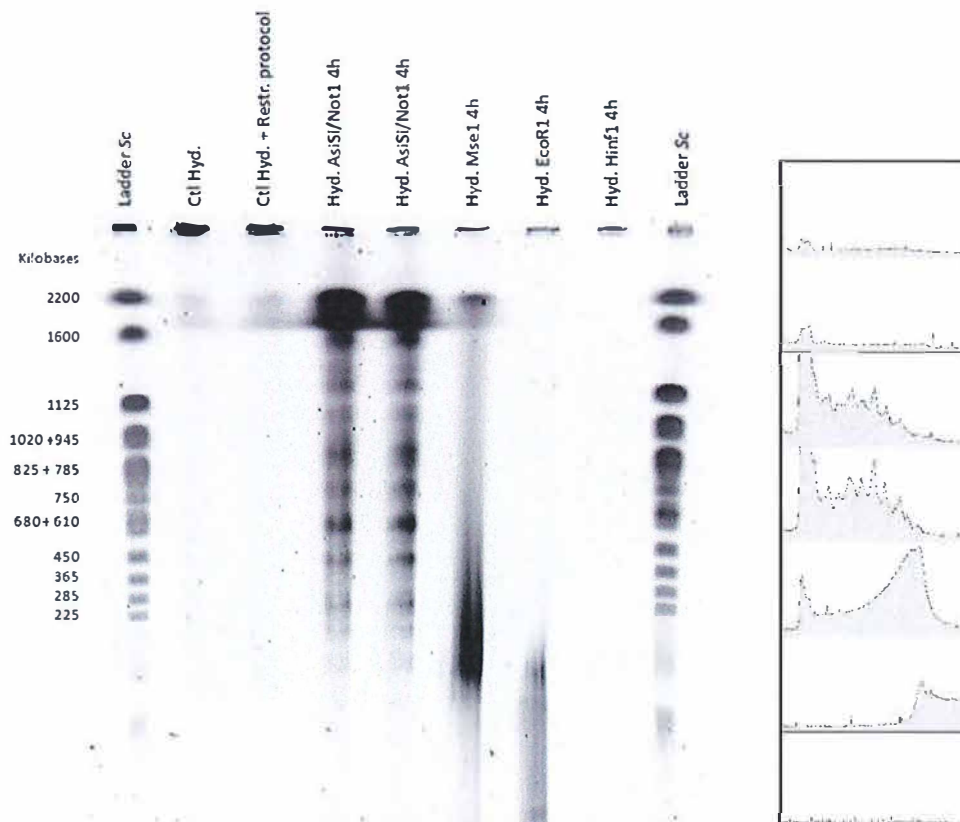


### Paramètres utilisés :

- CHEF DRII
- Agarose : 0,8%
- Voltage : 190V
- Switch time : 60-185s
- Temps de migration : 22h
- Température : ~3°C

Figure 45: Profils restriction d'individus *A. vaga* hydratés. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 190V avec un temps d'impulsion variant de 60 à 185s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 0,8%. Le puit n°2 contient un échantillon ayant subi le protocole de digestion mais sans enzyme. Les autres échantillons ont été digérés par AsiSi/Not1 pendant 4h. La moitié des échantillons ont été produits avec de l'agarose *Clean Cut*.

## Annexes VIII : Restriction par AsiSi/Not1, Mse1, EcoR1 et Hinf1 4h



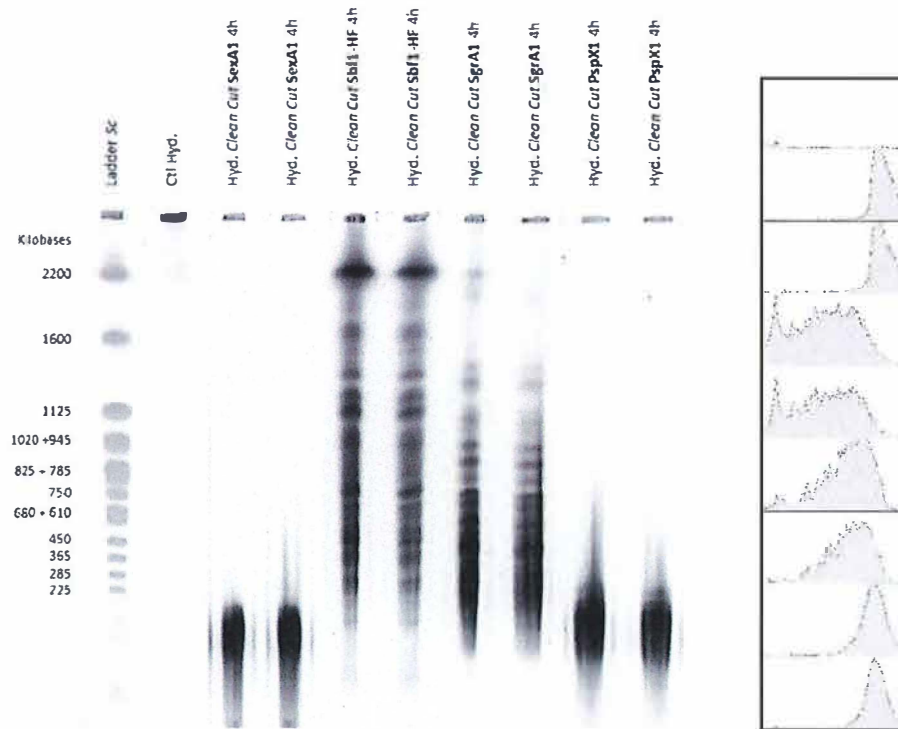
### Paramètres utilisés :

- CHEF MAPPER
- Agarose : 0,5%
- Voltage : 4,5V
- Switch time : 60-185s
- Temps de migration : 22h
- Température : 10°C

Figure 46 : Profils restriction d'individus *A. vaga* hydratés. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 4,5V/cm avec un temps d'impulsion variant de 60 à 185s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 0,5%. Le puit n°2 contient un échantillon ayant subi le protocole de digestion mais sans enzyme. Les autres échantillons ont été digérés respectivement par AsiSi/Not1 (2×), Mse1, EcoR1 et Hinf1.



## Annexes IX : Restriction par SexA1, Sbf1, SgrA1 et PspX1 4h

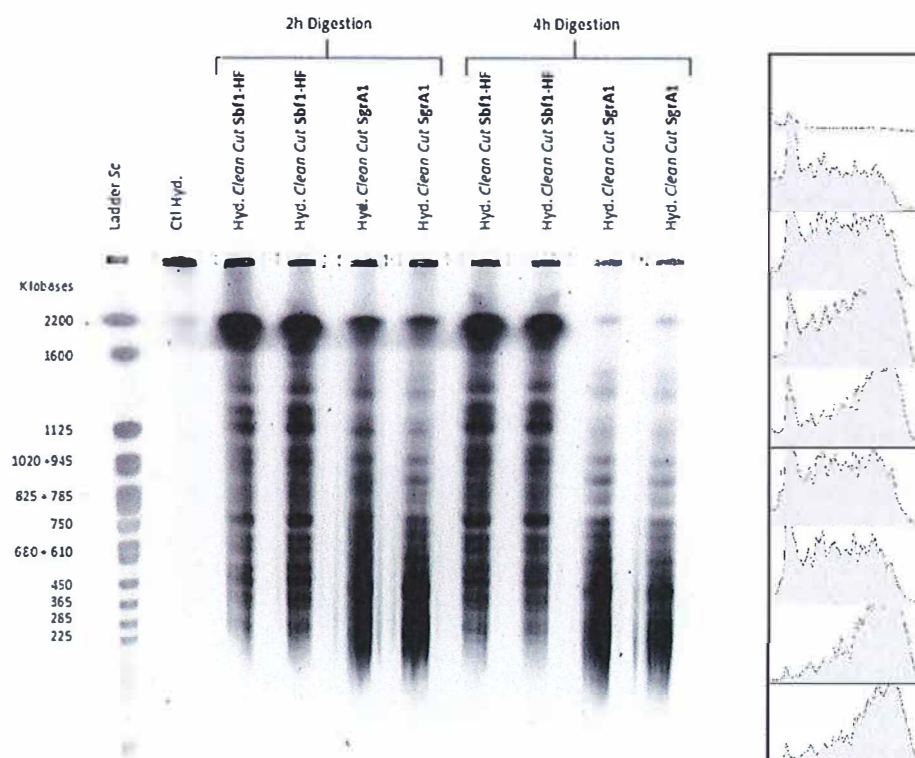


### Paramètres utilisés :

- CHEF MAPPER
- Agarose : 0,8%
- Voltage : 5,5V
- Switch time : 60-185s
- Temps de migration : 22h
- Température : 14°C

Figure 47 : Profils restriction d'individus *A. vaga* hydratés. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 5,5V/cm avec un temps d'impulsion variant de 60 à 185s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 0,8%. Les échantillons ont été digérés respectivement par SexA1 (2×), Sbf1-HF (2×), SgrA1 (2×), PspX1 (2×).

## Annexes X : Restriction par Sbf1 ou SgrA1 pendant 2 ou 4h



### Paramètres utilisés :

- CHEF MAPPER
- Agarose : 1%
- Voltage : 5,5V
- Switch time : 50-150s
- Temps de migration : 22h
- Température : 14°C

Figure 48 : Profils restriction d'individus *A. vaga* hydratés. Le ladder correspond au caryotype non-traité de *Saccharomyces cerevisiae* (Hespeels *et al.*, 2014). Chaque échantillon contient approximativement 1.000 bdelloïdes. Le temps de migration était de 22h à 5,5V/cm avec un temps d'impulsion variant de 50 à 150s. Le pourcentage du LMP agarose du gel était de 1%. Les échantillons ont été digérés par Sbf1-HF ou SgrA1 pendant 2 ou 4h.